

Aus der Klinik für Augenheilkunde
Der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med Salvatore Grisanti

Energiestoffwechsel und Fluoreszenzlebensdauer des retinalen Pigmentepithels unter Autophagieinhibition

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
aus der Sektion Medizin
vorgelegt von
Gerd Richard Förster
aus Wittenberg

Lübeck, den 15.02.2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Yoko Miura
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Verena-Wilbeth Sailer

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2021

Zum Druck genehmigt: 10.12.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Zusammenfassung

Motivation: Das retinale Pigmentepithel (RPE) bildet die äußere Schicht der Netzhaut. Als Ursache für die Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) wird eine ungenügende Autophagieleistung der Zellen, also deren Unfähigkeit, nicht benötigte Moleküle abzubauen, diskutiert. Das Ziel dieser Arbeit war es, den Energiestoffwechsel von ex-vivo RPE unter Autophagieinhibition zu untersuchen und auf eine Korrelation von dessen Fluoreszenzlebensdauer (FLD) mittels Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (FLIO) zu prüfen.

Methoden: Die Untersuchungen wurden an porzinen ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten durchgeführt. Die Explantate der Versuchsgruppe wurden mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 (1×10^{-8} M, 24 h) behandelt und mit unbehandelten Explantaten (DMSO) der Kontrollgruppe verglichen. Die Vitalität der RPE-Zellen wurde mittels eines Calcein-Tests untersucht. Die autophagiehemmende Wirkung von Bafilomycin A1 wurde durch Messung intrazellulärer Autophagosome bestätigt. Um den Effekt dieser Autophagiehemmung auf den Energiestoffwechsel nachzuvollziehen, wurde dieser anhand der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) und extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) mit Hilfe des Seahorse-XF-Analyzers untersucht. Im Anschluss wurde die FLD der Organkulturen mittels FLIO (Anregungswellenlänge 473 nm, Photonendetektion in den zwei Spektralkanälen SSC (498-560 nm) und LSC (560-700 nm)) bestimmt. Um die FLD-Messung der Explantate in Kulturmedium zu ermöglichen, wurde ein Spiegel in einem Winkel von 45° vor der FLIO-Kamera positioniert.

Ergebnisse: Die Inkubation der Organkulturen mit Bafilomycin A1 führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Anstieg der Zelltodrate. Eine autophagiehemmende Wirkung von Bafilomycin A1 wurde nachgewiesen. Die OCR des autophagieinhibierten RPE zeigte sich signifikant reduziert (z.B. basale Zellatmung von $220 \text{ pmol/min} \pm 43 \text{ pmol/min}$ zu $147 \text{ pmol/min} \pm 62 \text{ pmol/min}$). Die ECAR als Indikator der glykolytischen Aktivität zeigte sich nicht signifikant verändert. Weiterhin konnte mittels FLIO für die autophagieinhibierten RPE-Zellen eine verlängerte FLD nachgewiesen werden. Diese betrug in beiden Spektralkanälen ca. 350 ps und war maßgeblich auf eine Verlängerung der kurzen Komponente τ_1 in beiden Spektralkanälen zurückzuführen.

Schlussfolgerungen: Die Ergebnisse der Stoffwechselanalyse zeigen, dass eine Autophagiehemmung die mitochondriale Zellatmung von RPE-Zellen senkt. Diese Veränderung der mitochondrialen Funktion konnte mittels FLIO detektiert werden. FLIO zeigt damit das Potential, in Zukunft zur Diagnostik von degenerativen Augenkrankheiten, wie AMD, eingesetzt werden zu können.

Abstract

Motivation: The retinal pigment epithelium (RPE) is the outermost layer of the retina. Reduced autophagy function, which leads to the inability of the RPE-cells to degrade and recycle unnecessary molecules, is debated as a key factor of the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). The purpose of this thesis was to examine the energy metabolism of ex-vivo RPE under autophagy inhibition and its correlation with its fluorescence lifetime (FLT) using fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy (FLIO).

Methods: For this study, porcine ex-vivo RPE/choroid-explants were examined. The explants of the experimental group were exposed to the autophagy inhibitor Bafilomycin A1 (1×10^{-8} M, 24 h) and compared with untreated explants (DMSO) of the control group. The vitality of the RPE-cells was examined with a calcein-test. The inhibitory effect of Bafilomycin A1 on autophagy was verified by measuring intracellular autophagosomes. To understand the effects of the autophagy inhibition on the energy metabolism of the RPE, the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) was measured by use of a Seahorse-XF-Analyzer. The FLT of the explants was examined by FLIO (excitation 473 nm, photon detection in two spectral channels SSC (498-560 nm) and LSC (560-700 nm)). To allow the measurement of the FLT of the tissue in culture medium, a mirror was positioned in a 45°-angle in front of the FLIO camera.

Results: The incubation of the explants with Bafilomycin A1 did not cause a significant increase of cell death compared with the control group. An autophagy inhibitory effect of Bafilomycin A1 was proven. The OCR of the autophagy impaired tissue was significantly reduced (e.g. basal cell respiration from 220 pmol/min \pm 43 pmol/min to 147 pmol/min \pm 62 pmol/min). The ECAR, an indicator of the glycolic activity, was not significantly altered. The FLT of the autophagy impaired tissue was prolonged (ca. 350 ps in both spectral channels). This was mainly due to the significant prolongation of the short component τ_1 in both spectral channels.

Conclusions: The results of the metabolic analysis showed that autophagy inhibition reduces the mitochondrial cellular respiration of the RPE-cells. FLIO was able to detect those changes in mitochondrial function. Someday, this may be used in clinical practice for the diagnosis of early stages of degenerative eye diseases such as AMD.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Grundlagen	2
2.1	Biologische Grundlagen	2
2.1.1	Makroskopische Anatomie des Auges	2
2.1.2	Anatomie des retinalen Pigmentepithels	3
2.1.3	Physiologie der Retina und des Retinalen Pigmentepithels	4
2.2	Grundlagen des Energiestoffwechsels	5
2.2.1	Adenosintriphosphat (ATP)	6
2.2.2	Die Glykolyse	6
2.2.3	Die Zellatmung	7
2.3	Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)	8
2.4	Autophagie und deren Bedeutung in der Ausprägung von AMD	10
2.5	Bafilomycin A1	11
2.6	Physikalische Grundlagen	11
2.6.1	Fluoreszenz	11
2.6.2	Die Fluoreszenzlebensdauer (FLD)	13
2.6.3	Fluorophore der menschlichen Netzhaut	14
2.7	Energiestoffwechselformung mittels Seahorse-XF-Analyzer	15
2.7.1	Die untersuchten mitochondrialen Funktionen	16
2.7.2	Die untersuchten glykolytischen Funktionen	19
2.8	Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)	21
2.8.1	Aufbau und Funktion von FLIO	21
2.8.2	Bisherige Anwendungen von FLIO – in vivo	23
2.8.3	Bisherige Anwendungen von FLIO – ex vivo	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Gewinnung der ex-vivo-RPE/Choroidea-Explantate	26
3.2	Behandlung der Explantate mit Bafilomycin A1	27
3.3	Vitalitätstest mittels Calcein-AM	28
3.4	Autophagieinhibitionsnachweis von Bafilomycin A1	29
3.5	OCR/ECAR-Messungen	30
3.5.1	Etablierung der OCR/ECAR-Messungen von ex-vivo RPE/Choroidea - Explantaten	31
3.5.2	Durchführung der OCR-Messung	32
3.5.3	Durchführung der ECAR-Messung	33
3.5.4	Berechnung der mitochondrialen und glykolytischen Funktionen	33
3.6	Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLD)	34
3.6.1	Etablierung der Messung der FLD von ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten mittels FLIO	34
3.6.2	Durchführung der FLD-Messungen	35
3.6.3	Auswertung der FLD-Messungen	36
3.7	Statistische Methoden	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Zellvitalitätstest mit Calcein-AM	39
4.2	Bestimmung der Autophagosomenanzahl	40
4.3	Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR)	41
4.4	Messung der Extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR)	44

4.5 FLD-Messung.....	46
5 Diskussion der Studienergebnisse.....	49
5.1 Energiemetabolismus der RPE-Zellen unter Autophagieinhibition	49
5.1.1 Mitochondriale Aktivität der RPE -Zellen unter Autophagieinhibition.....	49
5.1.2 Glykolytische Aktivität der RPE -Zellen unter Autophagieinhibition.....	50
5.2 FLD der RPE-Zellen unter Autophagieinhibition	52
5.3 Limitierungen der Arbeit	54
5.3.1 Das verwendete Organkulturmodell	54
5.3.2 Kritik an der Methodik der OCR- ECAR- und FLD-Messungen.....	56
6 Abkürzungsverzeichnis.....	57
7 Literaturverzeichnis.....	59
8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	67
9 Anhang	68
9.1 Auswirkungen von Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A auf die FLD von ex-vivo RPE	69
9.2 Herstellernachweise	72
9.3 Geräte und Hilfsmittel	73
9.4 Chemikalien	75
9.5 Verbrauchsmaterialien.....	75
9.6 Kitsysteme.....	76
9.7 Software	76
9.8 Protokolle	77
10 Lebenslauf	79
11 Danksagung.....	80

1 Einleitung und Fragestellung

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) gilt als die häufigste Ursache für Erblindungen in Industrienationen⁽⁵¹⁾. Im Verlauf dieser chronischen Erkrankung des höheren Lebensalters, kommt es zu Stoffwechselstörungen der Fotorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels (RPE). Die Konsequenz ist der degenerative Untergang der Zellen im Bereich der Makula Lutea, dem Bereich des schärfsten Sehens. Die Ursache der Augenkrankheit konnte noch nicht eindeutig identifiziert werden. Über die Beziehung von Ursache und Wirkung der unterschiedlichen Stoffwechseleränderungen wird weiterhin diskutiert. Als ein Aspekt der mit der Erkrankung assoziierten Veränderungen des RPE-Stoffwechsels, konnte die Verringerung der Autophagieleistung, also der Fähigkeit der Zellen überalterte und beschädigte Zellbestandteile abzubauen, identifiziert werden^(39, 53).

Fluoreszenz-Ophthalmoskopie (FLIO) ist eine vergleichsweise neue Form der Bildgebung, die auf die Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLD) des Augenhintergrundes beruht. Es gibt vielversprechende Hinweise darauf, dass sich FLIO als Methode eignet, Veränderungen des retinalen Energiestoffwechsels zu detektieren⁽⁷¹⁾.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand von porzinen ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten den Einfluss einer mit AMD-assoziierten Autophagiehemmung (Bafilomycin, 1×10^{-8} M, 24 h) auf den Energiestoffwechsel (mittels Seahorse-XF-Analyzer) sowie die FLD (mittels FLIO) der RPE-Zellen zu untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten nützlich sein, um in Zukunft eine frühere Diagnose degenerativer Netzhauterkrankungen wie AMD mittels FLIO zu ermöglichen.

2 Grundlagen

2.1 Biologische Grundlagen

Das folgende Kapitel soll einen grundlegenden Überblick über Bau und Funktion von Auge und Netzhaut mit besonderem Fokus auf das retinale Plattenepithel (RPE) ermöglichen.

2.1.1 Makroskopische Anatomie des Auges

Die Netzhaut (Retina) ist Bestandteil des Auges, einem Organ, welches die Aufnahme und Vorverarbeitung von Lichtreizen und damit die visuelle Wahrnehmung ermöglicht. Licht gelangt über die Hornhaut (Cornea), der zwischen den Iriden befindlichen Pupille, der am Corpus Ciliare aufgehängte Linse und dem aus einer gallertartigen Substanz bestehenden Glaskörper (Corpus Vitreum) zur Netzhaut. Diese ist für die Umwandlung von Licht in elektrische Signale verantwortlich, welche über den Sehnerv (Nervus Opticus) zur Sehrinde des Gehirns weitergeleitet werden und dort eine visuelle Wahrnehmung ermöglichen. Zwei besondere Bereiche der Netzhaut dienen bei der Funduskopie als Orientierung: Der gelbe Fleck (Macula Lutea) ist der Punkt des schärfsten Sehens. Anatomisch erscheint er als ca. 1,5 mm große Einsenkung in der Netzhaut, die als Fovea Centralis bekannt ist. Dagegen ist die Papilla Nervi Optici das anatomische Korrelat des blinden Flecks. An diesem Punkt befindet sich die Austrittsstelle des Sehnerven und der versorgenden Blutgefäße. Das Sehen ist hier unmöglich⁽²⁹⁾. (Vgl. Abbildung 1)

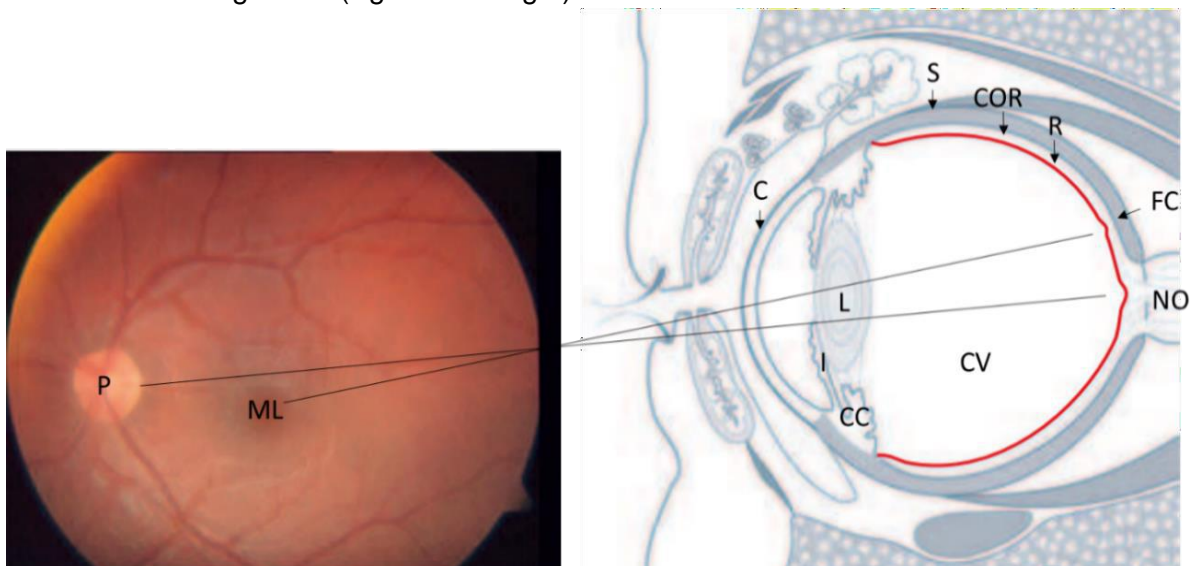


Abbildung 1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges: C: Cornea, I: Iris, CC: Corpus Ciliare, L: Linse, CV: Corpus Vitreum, R: **Retina** (rot hervorgehoben), NO: Nervus Opticus, S: Sklera, ML: Macula Lutea, P: Papille; Quelle: modifiziert nach⁽¹⁰⁾

2.1.2 Anatomie des retinalen Pigmentepithels

Die Netzhaut lässt sich in zwei Schichten teilen: Das einschichtige, äußere Blatt wird stratum pigmentosum genannt und besteht ausschließlich aus RPE-Zellen. Das innere Blatt, oder stratum nervosum, weist im hinteren Augenabschnitt einen hochkomplexen Aufbau auf, welcher gemeinhin in neun Schichten untergliedert wird und die ersten drei der insgesamt vier Neurone der Sehbahn enthält: Die Fotorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen), bipolaren Zellen und Ganglienzellen. Die Axone der Ganglienzellen verlassen als Sehnerv das Auge und werden im Thalamus auf das vierte Neuron, das Corpus Geniculatum Laterale umgeschaltet, welches den Reiz zum visuellen Cortex leitet⁽⁷⁹⁾. Darüber hinaus finden sich Horizontalzellen, Müller-Zellen und amakrine Zellen. Die Netzhaut ist invers gegliedert. Das bedeutet, dass das Licht auf dem Weg zu den Fotorezeptorzellen, wo die Signalumwandlung erfolgt, die die signalleitenden Netzhautanteile durchqueren muss⁽⁷⁵⁾. (Vgl. Abbildung 2)

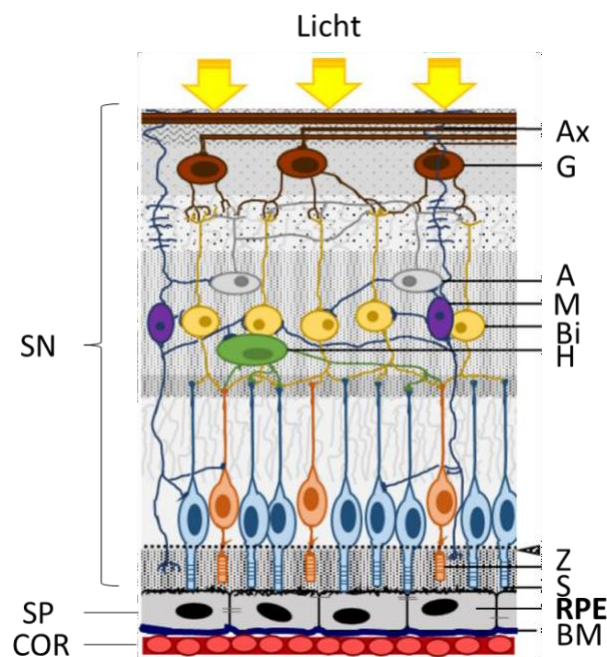


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Retinaschichten: COR: Chorioidea, SP: Stratum Pigmentosum, SN: Stratum Nervosum, BM: Bruch-Membran, **RPE: Retinales Pigmentepithel**, S: Stäbchen, Z: Zapfen, H: Horizontalzellen, Bi: Bipolare Zellen, M: Müller-Zellen, A: Amakrine Zellen, G: Ganglienzellen, Ax: Axone; Quelle: modifiziert nach⁽⁴³⁾

Das RPE ist ein einschichtiges, isoprismatisches Gewebe. Dieses liegt mit seiner Basalmembran der 2 µm dicken Bruch-Membran auf, welche das RPE von der Aderhaut trennt. Die Blutversorgung des RPE erfolgt über Äste der Arteria Ophthalmica und ist durch die Blut-Retina-Schranke von potenziell schädigenden Stoffen in der Blutbahn geschützt. Deren Barrierefunktion wird maßgeblich durch die zwischen den vaskulären Endothelzellen

befindlichen tight junctions bestimmt⁽¹⁾. Die Dicke der menschlichen Aderhaut wird mit ca. 300 µm beschrieben⁽²³⁾.

Die hexagonalen RPE- Zellen sind bienenwabenartig angeordnet und ca. 14 µm breit und 10-14 µm lang. Mit zottenartigen Ausläufern ragen die Zellen in den Sehventrikel hinein und lagern sich an die Rezeptorfortsätze der Lichtsinneszellen, Stäbchen und Zapfen, an⁽⁷⁹⁾. Wie der Name suggeriert, zeichnet sich RPE durch ein hohes Vorkommen von mit dem Pigment Melanin gefüllten Melanosomen aus. Deren Konzentration ist im Bereich der Makula leicht erhöht, im restlichen Fundus aber annähernd homogen verteilt⁽⁷³⁾. Des Weiteren enthalten die Zellen auffällig viele Mitochondrien, Lysosomen und viel glattes Endoplasmatisches Retikulum, was auf einen aktiven Stoffwechsel schließen lässt⁽⁷⁹⁾.

2.1.3 Physiologie der Retina und des Retinalen Pigmentepithels

Die beiden beschriebenen Netzhautschichten stratum nervosum und stratum pigmentosum bilden eine funktionale Einheit. Gendefekte, die eine Degeneration des RPE zur Folge haben, sind mit dem Untergang der lichtsensitiven Zellen in der Neuroretina verbunden⁽⁷⁴⁾. Die Funktionen des RPE sind vielfältig: (Vgl. Abbildung 3)

Diese Fotorezeptorzellen (Stäbchen und Zapfen) weisen nach außen gerichtete, von den RPE-Ausläufern umschlossene Rezeptorfortsätze auf. In deren Außensegmenten (POS) findet die fotoelektrische Transduktion statt: Photonen werden in den Stäbchen von dem Sehpurpur Rhodopsin absorbiert. Dieser besteht neben dem Glykoprotein Opsin aus 11-cis-Retinal. Bei dessen Aktivierung wandelt es sich in sein Konfigurationsisomer zu all-trans-Retinal, welches über die Aktivierung einer Signalkaskade ein entsprechendes, neuronales Signal erzeugt^(9, 79). Da die Fotorezeptoren nicht mit dem für die Re-Isomerisierung des all-trans-Retinals notwendigen Enzym (cis-trans-Isomerase) ausgestattet sind, erfolgt diese in den direkt benachbarten RPE-Zellen. Durch die Wiedergewinnung von 11-cis-Retinal ermöglicht das RPE somit einen erneuten Ablauf der visuellen Signaltransduktion⁽⁷⁴⁾.

Durch die im Licht enthaltene Energie kann es in menschlichem Gewebe zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kommen⁽⁶⁶⁾. ROS können durch spontane, chemische Reaktionen Schäden an zelleigenen Molekülen verursachen und die Funktion der gesamten Zelle herabsetzen. Dieser Zustand wird oxydativer Stress genannt⁽⁵³⁾. Um die Erregbarkeit der Fotorezeptoren zu gewährleisten, müssen aufgrund des hohen oxidativen Stresses in der Netzhaut die POS regelmäßig ersetzt werden. Dafür werden die beschädigten POS von dem RPE phagozytiert und verdaut. Die starke Pigmentierung des RPE absorbiert reflektiertes Licht und erhöht so die Qualität der visuellen Wahrnehmung⁽⁷³⁾.

Da die Neuroretina selbst nicht mit Blut versorgt wird, erfolgt der Transport von Vitaminen, Mineral- und Nährstoffen von und der Abtransport von Stoffwechselendprodukten in Richtung Chorioidea über das RPE. Der Hauptnährstoff der Retina stellt der Einfachzucker Glucose dar⁽⁹⁾. Für den Sehprozess ist es unabdingbar, dass die Ionenkonzentration des subretinalen Spalts durch die RPE-Zellen konstant gehalten wird. Gleichzeitig muss das, in den metabolisch stark aktiven Zellen der Neuroretina entstehende und dem Ionenstrom nachfließende Wasser, über Aquaporine abgeführt werden können, um Ödeme zu vermeiden. Das RPE reguliert darüber hinaus den lokalen pH-Wert über den Austausch von Bicarbonat und Milchsäure⁽⁷⁴⁾. Eine weitere wichtige Funktion des RPE-Gewebes ist die Sekretion von Signalproteinen. Zu den sezernierten Substanzen gehören eine Reihe von Wachstumsfaktoren (FGF-1,2,5; IGF-1; PDGF, NGF, VEGF), die das Überleben der Fotorezeptoren, sowie die Struktur deren unterstützenden Strukturen gewährleisten⁽⁷⁴⁾.

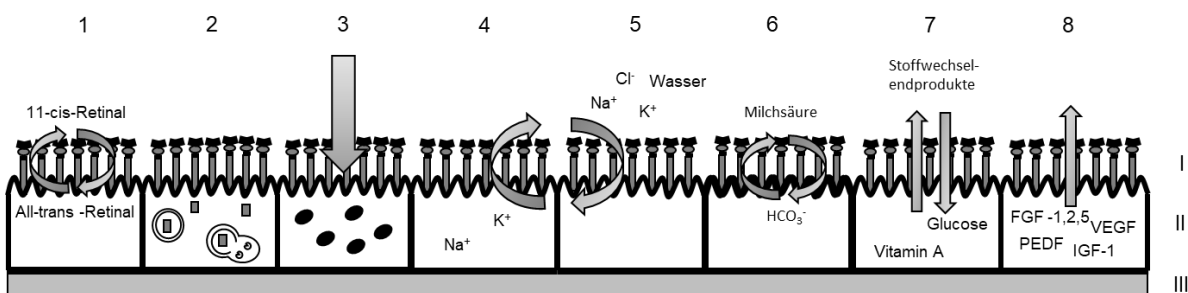


Abbildung 3 Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung verschiedener Funktionen des RPE: Das Recycling von 11-cis- zu all-trans-Retinal, welches den erneuten Ablauf des visuellen Zyklus ermöglicht (1), Phagozytose und Abbau von gealterten oder beschädigten Fotorezeptoraußensegmenten (2), Absorption von reflektiertem Licht (3), dem Aufrechterhalten des Elektrolyt-, pH und Volumengleichgewichts (4,5,6), der Steuerung des Stofftransports zwischen Aderhaut und Fotorezeptoren (7) sowie der Sekretion von Signalproteinen (8). Die RPE-Zellen (II) befinden sich zwischen Chorioidea (III) und Fotorezeptorzellen (I); Quelle: modifiziert nach⁽⁷⁴⁾ S. 846

2.2 Grundlagen des Energiestoffwechsels

Das nachfolgende Kapitel beschreibt die Bedeutung der zellulären ATP-Synthese und erläutert den grundsätzlichen Ablauf der beiden ATP-Synthesewege, die Glykolyse und die Zellatmung. (Vgl. Abbildung 4)

2.2.1 Adenosintriphosphat (ATP)

Adenosintriphosphat (ATP) ist ein Nukleotid bestehend aus Adenin, Ribose und drei Phosphatgruppen. Es gilt als universelle Energiewährung des menschlichen Körpers und als das bedeutendste Produkt seines Energiestoffwechsels. Bei der Hydrolyse von ATP zu Adenin-Diphosphat (ADP) wird Energie frei, die von der Zelle an energetisch ungünstigere Reaktionen gekoppelt werden kann, um deren Ablauf zu ermöglichen. Im Anschluss muss ADP unter Energieaufwand wieder zu ATP phosphoryliert werden. Ohne die Fähigkeit der ATP-Regeneration wäre das Überleben unmöglich⁽³³⁾.

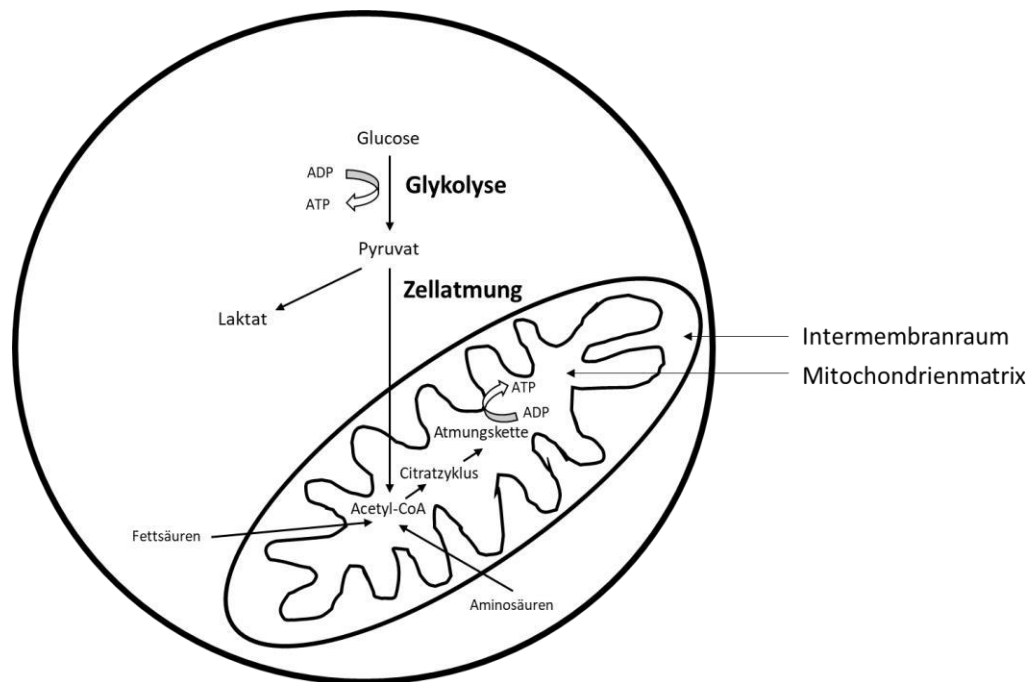


Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Zelle und der beiden wichtigsten ATP-regenerierenden Stoffwechselwege des Menschen: Während die Glykolyse im Zytoplasma abläuft, findet die Zellatmung in den Mitochondrien statt; Quelle: modifiziert nach⁽³⁵⁾

2.2.2 Die Glykolyse

Die Glykolyse bezeichnet den Abbau von Glukose (Traubenzucker). Sie findet im Zytoplasma aller menschlichen Zellen statt und wandelt ein Molekül Glukose in zehn Einzelreaktionen zu zwei Molekülen Pyruvat um. Im Rahmen der anaeroben Glykolyse werden pro Glukosemolekül netto zwei ATP-Moleküle gewonnen. Um das Reaktionsprodukt dem unmittelbaren Reaktionsgeschehen abzuführen und die Weiterführung des Reaktionsablaufs zu gewährleisten, wird das Pyruvat zu Laktat reduziert. Unter aeroben Bedingungen reagiert Pyruvat im Mitochondrium enzymatisch zu Acetyl-CoA und kann dort im Rahmen der Zellatmung bei einem Energiegewinn von insgesamt 32-ATP-Molekülen weiter abgebaut werden⁽⁸⁾.

2.2.3 Die Zellatmung

Das Mitochondrium wird oft als das „Kraftwerk“ der Zelle bezeichnet. In der dort ablaufenden sauerstoffabhängigen oxidativen Phosphorylierung wird der größte Teil der zum Überleben notwendigen Energie in Form von ATP generiert. Das Mitochondrium wird von einer äußeren Membran umschlossen und von einer inneren Membran in zwei Reaktionsräume getrennt. In der Mitochondrienmatrix läuft der Citratzyklus ab, der gemeinsamen Endstrecke der Abbauwege der drei Hauptnähstoffe Kohlenhydrate, Fette und Aminosäuren.

Ein Molekül Acetyl-CoA wird im Verlauf des Citratzyklus bei Gewinn von drei Molekülen Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADH), einem Molekül Flavin-Adenin-Dinukleotid (FADH_2) und einem Molekül Guanosintriphosphat (GTP) zu Kohlendioxid (CO_2) abgebaut, welches als Abfallprodukt abgeatmet wird. Während der Phosphatrest des GTP direkt verwendet werden kann, um ein ATP-Molekül zu regenerieren, dienen NADH und FADH_2 als sogenannte Redoxäquivalente dazu, um Elektronen auf die an der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Komplexe der Atmungskette zu übertragen.

Dieser Elektronentransfer (Vgl. Abbildung 5) ist an einen endogenen Prozess gekoppelt, welcher Protonen in hoher Konzentration durch die innere Mitochondrienmembran in den Intermembranraum pumpt. Die ATP-Synthase, ein ebenfalls in der inneren Mitochondrienmembran befindliches Enzym, nutzt wiederum die potenzielle Energie des sich so aufbauenden Protonengradienten, um ADP zu ATP zu phosphorylieren. Diesen Prozess bezeichnet man als oxidative Phosphorylierung. Sauerstoff wird hierbei im vierten und letzten Redoxkomplex vor der ATP-Synthase verbraucht⁽⁸⁾.

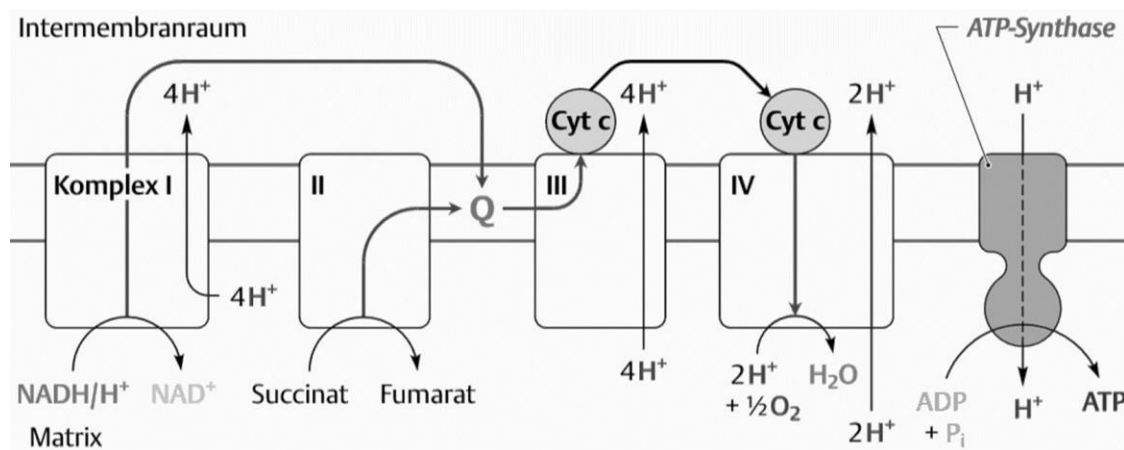


Abbildung 5 Darstellung des Elektronentransfers entlang der vier Atmungskettenkomplexe im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung; Quelle:⁽⁶⁴⁾

2.3 Altersabhängige Makuladegeneration (AMD)

Bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) handelt es sich um eine chronische, degenerative Erkrankung der Netzhaut, welche hauptsächlich im fortgeschrittenen Alter auftritt. Eine beginnende AMD wird über Einschränkungen der Sehfähigkeit im Zentrum des Sichtfeldes und eine verzerrte Wahrnehmung von Gegenständen und Räumen (Metamorphopsie) symptomatisch⁽⁶²⁾.

Die AMD-Diagnose wird anhand pathologischer Veränderungen des Augenhintergrundes gestellt. Diese betreffen vorwiegend die Makula lutea. Durch das Voranschreiten der Krankheit gehen hier Fotorezeptoren irreversibel zu Grunde. Obwohl die Sehfähigkeit in den peripheren Netzhautbereichen erhalten bleibt, führt der zunehmende Visusverlust im zentralen Netzhautabschnitt zu funktioneller Blindheit⁽²⁷⁾. Mittels Elektronenmikroskopie wurde bei AMD-Patienten eine Verdickung der Bruchmembran sowie Lipidakkumulationen in den RPE-Zellen erkennbar⁽⁴⁶⁾. Diese Lipidablagerungen entstehen im Rahmen des Alterungsprozesses und sind makroskopisch als sogenannte Drusen wahrnehmbar. Sie bestehen aus einer Vielzahl von heterogenen Molekülen, insbesondere Lipofuszin, einem Gemisch von verschiedenen Stoffwechselendprodukten des Sehprozesses. Die Lipofuszinansammlungen im RPE-Gewebe stehen im Verdacht, am Voranschreiten von AMD beteiligt zu sein⁽⁷⁵⁾.

AMD wird anhand der klinischen Manifestation in eine exsudative und nicht-exsudative Verlaufsform unterteilt. Die exsudative AMD ist durch pathologisches Gefäßwachstum in der Retina gekennzeichnet, was durch die vermehrte Ausschüttung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) verursacht wird⁽⁶⁾. Diese Gefäßneubildungen können zu Blutungen, Ödemen und Vernarbungen führen. Die exsudative Verlaufsform macht etwa 10% aller AMD-Fälle aus⁽³²⁾ und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Die wichtigste therapeutische Maßnahme ist die interventionelle anti-VEGF-Therapie⁽⁷⁾. Gegen die langsamer voranschreitende, nicht-exsudative AMD gibt es momentan keine kausalen Therapien. Es gibt Hinweise, dass die Anwendung von Antioxidantien und Zinkoxid das Fortschreiten der Krankheit verlangsamt⁽⁸⁰⁾.

Die altersabhängige Makuladegeneration ist eine Volkskrankheit. In Deutschland ist es die häufigste Ursache für Erblindungen. Etwa 67 Millionen Europäer sind von der Erkrankung betroffen⁽⁵¹⁾. Diese Prognosen unterstreichen die Relevanz für weitere medizinischer Forschung zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie der Erkrankung.

Die pathophysiologischen Ursachen für AMD sind multifaktoriell und noch nicht vollständig verstanden. Vielen verschiedenen Erklärungsansätzen gemein ist die Hypothese, oxidati-

ver Stress sei ein kausaler Faktor für die Pathogenese von AMD⁽²⁵⁾. Die vermehrt anfallenden Sauerstoffradikale (ROS) können durch spontan ablaufende chemische Reaktionen die Mitochondrien des RPE schädigen⁽²⁵⁾. Dysfunktionale Mitochondrien werden wiederum mit einer zusätzlich erhöhten ROS-Bildung in Verbindung gebracht⁽⁵⁹⁾. So konnte an RPE-Gewebe von AMD-Patienten in vitro, bei verminderter mitochondrialer Aktivität, eine höhere ROS-Bildungsrate nachgewiesen werden als in gesundem RPE⁽²⁸⁾. Dieser Teufelskreis führt zu einer Dysfunktion der Mitochondrien im RPE-Gewebe und zum Einbruch der ATP-Gewinnung der Atmungskette, was den Energiestoffwechsel der Netzhaut in eine Krise stürzt. Diese ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

Unter physiologischen Bedingungen wird der hohe Energiebedarf der Fotorezeptorzellen hauptsächlich durch den glykolytischen Abbau, von durch das RPE bereitgestellter Glukose, gedeckt⁽²⁴⁾. Die Glukose wird unter ATP-Gewinn zu Laktat verstoffwechselt, welches zurück in die RPE-Zellen transportiert wird und durch Oxidation zu Pyruvat der Zellatmung zugeführt wird⁽⁴¹⁾. Dabei verhindert die hohe Laktatkonzentration in den RPE-Zellen den glykolytischen Abbau von Glukose vor Ort⁽²⁴⁾. Mitochondriale Dysfunktion stört dieses empfindliche Gleichgewicht. Untersuchungen an RPE-Zellen unter Sauerstoffmangel zeigen, dass diese zunehmend egoistisch mit Glukose umgehen und diese für die Aufrechterhaltung der eigenen Energieproduktion einsetzen. Daraufhin degenerieren die Fotorezeptorzellen, da sie ihrer Energiequelle beraubt sind.

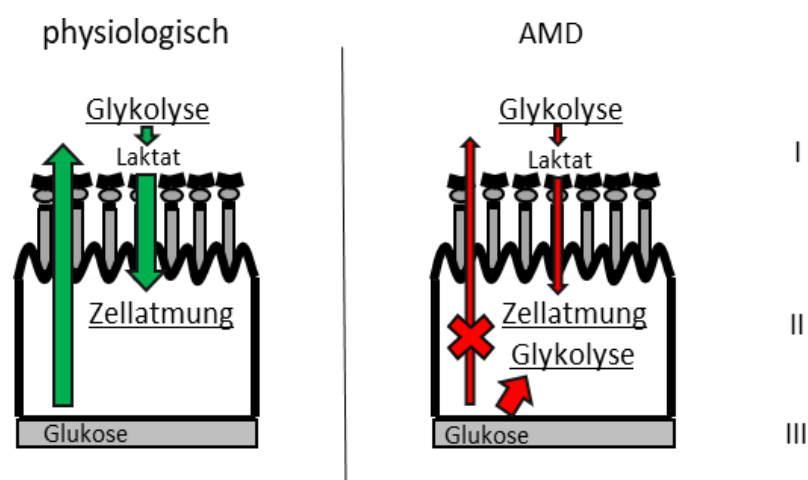


Abbildung 6 Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung des Energiestoffwechsels der Retina des Gesunden (links) und des AMD-Erkrankten (rechts): Aufgrund von oxidativen Stress kommt es zur Dysfunktion der Mitochondrien des erkrankten RPE (II). Um seine Energieversorgung zu gewährleisten stellt das RPE seine ATP-Produktion auf den Abbau von Glukose um, statt diese von der Choroidea (III) zu den Fotorezeptorzellen (I) weiterzuleiten; Quelle: modifiziert nach⁽²⁶⁾ S.44

2.4 Autophagie und deren Bedeutung in der Ausprägung von AMD

Der Begriff Autophagie beschreibt den Abbau von zelleigenen oder zellfremden Proteinen oder anderen Makromolekülen in wiederverwertbare Molekülstrukturen durch Lysosomen. Lysosomen sind Organellen, die sich innerhalb einer begrenzenden Membran durch einen sehr niedrigen pH-Wert von vier bis fünf auszeichnen. Dieser ist für die Funktion der ca. 40-50 bekannten, lysosomalen Enzyme notwendig, welche für die Verdauung der Moleküle verantwortlich sind und wird über eine V-ATPase unter Energieverbrauch aufrechterhalten⁽⁷⁹⁾.

Eine der physiologischen Funktionen des RPE ist der Abbau der von den Fotorezeptoren abgestoßenen POS, welcher in Abbildung 7 dargestellt wird. Diese werden nach der Phagozytose von einer Doppelmembran umschlossen. Das so gebildete Vesikel wird Autophagosom genannt. Durch Fusion mit einem Lysosom wird das Autolysosom gebildet. Durch die zahlreichen lysosomalen Enzyme wird zuerst die Innere der beiden Membranen und anschließend das wiederzuverwertende Material selbst abgebaut. Die so entstehenden Zellbestandteile wie Aminosäuren, Monosacharide und Fettsäuren werden in das Zytosol abgegeben und können für die Synthese anderer Makromoleküle eingesetzt oder durch transepithelialen Transport der Neuroretina zugänglich gemacht werden⁽⁷⁹⁾.

Ist die Autophagiefähigkeit des RPE gestört, können durch oxidativen Stress geschädigte Mitochondrien nur unzureichend abgebaut und ersetzt werden, was die mitochondriale Aktivität des Gewebes reduziert. Zahlreiche Studien zu diesem Thema lassen darauf schließen, dass eine Autophagiedysfunktion des RPE eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von AMD spielt⁽⁴⁰⁾.

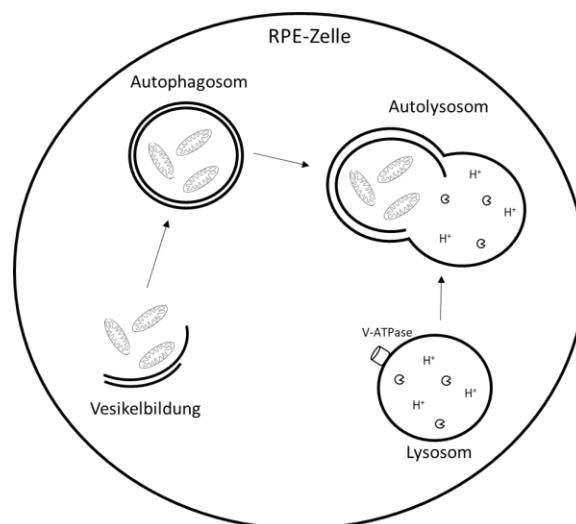


Abbildung 7 Schema des Makroautophagieprozesses; Quelle: modifiziert nach⁽⁴⁸⁾

2.5 Bafilomycin A1

In den nachfolgend vorgestellten Experimenten wurde RPE-Gewebe in der Versuchsgruppe mit der als potenter Autophagieinhibitor geltende Substanz Bafilomycin A1 behandelt. Pharmakologisch handelt es sich bei Bafilomycin A1 um ein Makrolidantibiotikum, welches von der Bakteriengattung *Streptomyces griseus* isoliert werden konnte und durch einen makrocyclischen Laktonring charakterisiert wird⁽¹⁴⁾.

Bafilomycin A1 hemmt nicht-kompetitiv die Untereinheit C der V-ATPase ATP6V0C/V0⁽⁵²⁾, welche durch den aktiven Transport von Protonen in das Lysosom den pH-Wert der Organelle einstellt. Steigt daraufhin der pH-Wert über das lysosomenspezifische pH-Optimum von 4-5, reduziert dies die Reaktionsgeschwindigkeit der lysosomalen Enzyme. Des Weiteren inhibiert Bafilomycin A1 davon unabhängig die Fusion von Autophagosom und Lysosom zum Autolysosom durch Hemmung des Calciumcarriers Ca-P60A/SERCA⁽⁵²⁾.

2.6 Physikalische Grundlagen

Momentan wird der Einsatz der Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (FLIO) zur Diagnostik degenerativer Augenkrankheiten untersucht. In dem folgenden Kapitel werden zum besseren Verständnis der FLIO, grundlegende Begriffe wie Fluoreszenz und Fluoreszenzlebensdauer (FLD) sowie die am menschlichen Augenfundus befindlichen Fluorophore beschrieben.

2.6.1 Fluoreszenz

Licht ist elektromagnetische Strahlung, welche aus Photonen besteht und sich wellenartig im Raum ausbreitet. Dabei kann jeder spezifischen Wellenlänge (λ) eine Frequenz (f) zugeordnet werden. Das für das menschliche Auge sichtbare Licht liegt im Wellenlängebereich zwischen 400 nm und 750 nm. Die Wellenlänge bestimmt die menschliche Farbwahrnehmung. So wird Licht einer Wellenlänge von 460 nm als blau, von 550 nm als gelb und von 750 nm als rot wahrgenommen.

Die Energie der Photonen ist das Produkt der Strahlungsfrequenz und einer Konstanten h :

$$E \text{ (Photonenenergie)} = h \text{ (Planck'sches Wirkungsquantum)} * f \text{ (Frequenz)}$$

Je höher also die Frequenz, desto energiereicher ist die Strahlung. Blaues Licht ist demnach energiereicher als rotes.

Das Verständnis der Energie des Lichts ist entscheidend für das der Fluoreszenz. Die zugrundeliegenden Prozesse lassen sich anhand des Jablonski-Diagramms, welches in Abbildung 8 dargestellt ist, erklären: Die waagerechten Linien stellen Energieniveaus der Elektronen dar. Der vertikale Pfeil steht für die Lichtabsorption eines Moleküls. Die darin enthaltene Energie ist in der Lage, ein Elektron vom Grundzustand in einen angeregten Energiezustand (S1) zu versetzen. Um wieder zum Grundzustand zurückzukehren, muss das Elektron den energieärmsten aller angeregten Zustände durchlaufen. Auf dem Weg dahin wird Energie über Schwingungsrelaxation als Wärme frei. Fällt nun das Elektron endgültig auf das Ausgangsenergielevel zurück, kann die anfallende Energie in Form eines Photons emittiert werden. Dieser Prozess wird als Fluoreszenz bezeichnet⁽¹¹⁾.

Durch die Schwingungsrelaxation nimmt die Energie des Elektrons ab. Daher verschiebt sich das emittierte Licht im Vergleich zum absorbierten Licht in Richtung Rotbereich, was als Stokes Verschiebung bekannt ist. Die Intensität der Emission ist dabei direkt proportional zur Absorption, das Emissionsspektrum ist allerdings von dem Absorptionsspektrum unabhängig⁽¹¹⁾. Sowohl das Absorptions- als auch das Emissionsspektrum sind für den jeweiligen Fluorophor charakteristische Eigenschaften und werden nachfolgend mit den Symbolen λ_{ex} bzw. λ_{em} dargestellt. Dabei wird sich auf die jeweilige Wellenlänge mit maximaler Absorption bzw. Emission bezogen.

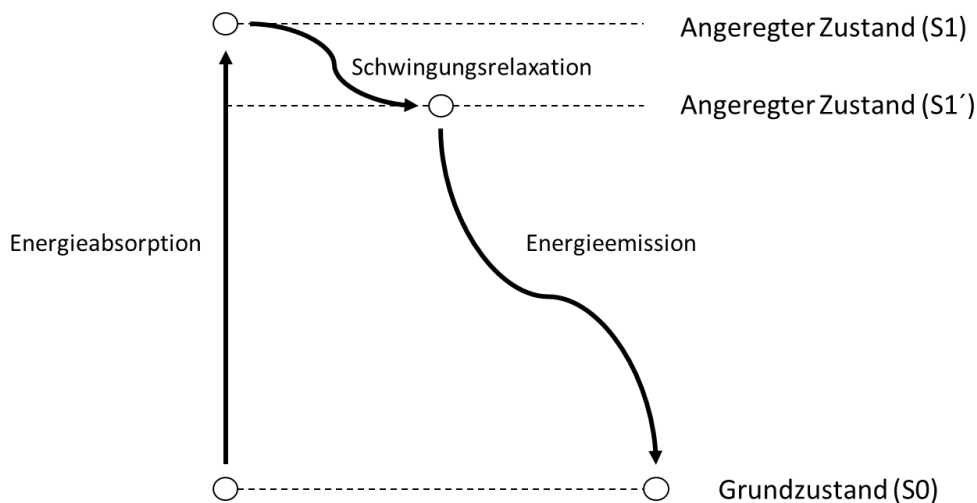


Abbildung 8 Jablonski-Diagramm; Quelle: modifiziert nach⁽⁶⁹⁾ S. 2

2.6.2 Die Fluoreszenzlebensdauer (FLD)

Lipofuszin, welches im Laufe des Lebens in retinalen Drusen akkumuliert, ist stark autofluoreszent. Dies wird bereits im klinischen Rahmen genutzt, um über eine quantitative Messung der Fundusautofluoreszenz (FAF) die Progredienz von AMD zu kontrollieren⁽¹²⁾. Die unterschiedliche Fluoreszenzintensität der Fluorophore führt jedoch dazu, dass die Signale stärker fluoreszierende Moleküle wie Lipofuszin, die Fluoreszenz von schwächer fluoreszierenden Molekülen, wie die der Elektronenüberträger NADH und FAD, überdecken⁽⁸¹⁾. Die Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLD) mittels FLIO ermöglicht es hingegen, auch Moleküle mit geringeren Fluoreszenzintensitäten zu erfassen.

Trägt man die Fluoreszenzintensität eines Moleküls über die Zeit auf, erkennt man, dass auf einen schnellen Intensitätsanstieg ein exponentieller Intensitätsabfall folgt. Dies ist in Abbildung 9 dargestellt. Das Profil dieses Fluoreszenzabfalls ist dabei für jeden Fluorophor eine charakteristische Eigenschaft. Die FLD wird mathematisch definiert, als die Zeit, in der die Fluoreszenzintensität auf $\frac{1}{e}$ (ca. 0,37 %) des Intensitätsmaximums abfällt⁽¹¹⁾. Sie ist im Gegensatz zur Fluoreszenzintensität konzentrationsunabhängig, reagiert aber auf Milieuschwankungen in der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors wie Proteinbindungszustand, Sauerstoffsättigung, Temperatur oder pH-Wert⁽⁶⁾. Daher könnte es sich bei der FLD-Messung auch um eine geeignete Methode handeln, um Schwankungen in der Mikroumgebung von RPE-Zellen und damit potenziell pathologische Veränderungen in dem Metabolismus des Gewebes zu detektieren⁽⁶⁹⁾.

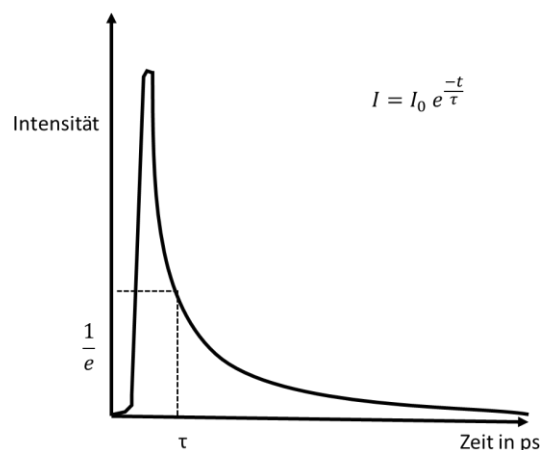


Abbildung 9 Beispielhafte Entwicklung des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors in Abhängigkeit der Zeit: Die FLD kann für den einzelnen Fluorophor als exponentielle Zerfallsfunktion der Fluoreszenz über der Zeit beschrieben werden; Quelle: modifiziert nach: ⁽³⁴⁾

2.6.3 Fluorophore der menschlichen Netzhaut

Moleküle, die fluoreszierende Eigenschaften aufweisen, werden Fluorophore genannt. Bedeutend für die Fluoreszenz der menschlichen Netzhaut sind vor allem Lipofuszin, Makulapigment, Melanin, advanced glycation endproducts (AGE), Kollagen, Elastin sowie die beiden Redoxcoenzyme NADH und FAD. Deren Fluoreszenzspektren und FLD sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Von allen Fluorophoren trägt das als Alterspigment bekannte Lipofuszin am meisten zur Fluoreszenzintensität des Augenhintergrundes bei⁽⁷¹⁾. Von den unter dem Begriff Lipofuszin zusammengefassten Verbindungen stehen insbesondere N-Retinylden-N-Retinyl-Ethanolamin (A2E) und atRALdi im Verdacht, an der Atrophie des RPE im Rahmen einer AMD-Erkrankung beizutragen⁽⁵⁵⁾.

Leutein, Zeaxanthin und Mesozeaxanthin werden unter dem Begriff Makulapigment zusammengefasst. Dieses tritt gehäuft im Bereich der Macula lutea der menschlichen Netzhaut auf. Dort schützt es die Retina durch Absorption im kurzwelligen, energiereichen Blaulichtspektrum um 460 nm vor Blaulichtschädigung. Des Weiteren wird dem Makulapigment eine Funktion als Antioxidans zugeschrieben⁽⁵⁵⁾.

Fluorophore der Netzhaut		Absorptionsspektrum λ_{ex} in nm	Emissionsspektrum λ_{em} in nm	FLD in ns
Lipofuszin	A2E	340 440	610	0,19
	atRALdi	290 432	510	-
Makulapigment		450-480	600-700	<0,1
Melanin		470	540	0,1-0,2
AGE		370	440	1,7
Kollagen I-IV Elastin		450-480	470-520	I 1,75 II 1,44 III 1,11 IV 1,62 Elastin 1,38
NADH		300-380	450-500	Frei 0,30 Gebunden 2,44
FAD		370 450	535	Frei 2,3 Gebunden 0,13

Tabelle 1 Absorptions- und Emissionsspektrum (bzw. Absorptions- und Emissionsmaxima) sowie FLD der wichtigsten Fluorophore der menschlichen Netzhaut; Quelle:⁽⁵⁵⁾

Ein Teil der emittierenden Fluoreszenz entfällt auf Kollagen und Elastin. Diese sich hauptsächlich im Zellzwischenraum befindenden Strukturproteine sorgen für Stabilität und Flexibilität des Gewebes. Es werden verschiedene Kollagentypen unterschieden. Es wird vermutet, dass die im Rahmen einer AMD-Erkrankung beobachtete Verdickung der Bruchmembran mit einem relativen Anstieg von Kollagen Typ IV einhergeht⁽⁵⁵⁾.

Das Pigment Melanin, welches für die namensgebende schwarze Färbung des RPEs verantwortlich ist, fluoresziert ebenso wie advanced glycation endproducts (AGE), welche durch die nichtenzymatische Reaktion von Zuckermolekülen mit Proteinen, Fetten und Aminosäuren entstehen. AGE treten vermehrt bei einem erhöhten Blutzuckerspiegel auf und sind eng mit der Entwicklung der Diabetischen Retinopathie assoziiert⁽⁵⁵⁾.

Die Moleküle NADH und FAD dienen im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung als Coenzyme für die Übertragung von Elektronen. Aufgrund seines Fluoreszenzspektrums kann NADH jedoch nur unzureichend durch FLIO erfasst werden. Bei FAD handelt es sich um die oxidierte Form seines Redoxpartners FADH₂. Während die reduzierte Form des Redoxpaares kaum fluoresziert, weist FAD ein $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ von 370 nm und 450 nm/535 nm auf und verändert je nach Proteinbindungsstatus seine FLD. Ungebunden beträgt diese 2,4 ns, gebunden 0,13 ns⁽⁵⁵⁾.

2.7 Energiestoffwechsellmessung mittels Seahorse-XF-Analyzer

Die Zelle verfügt über zwei bedeutende Wege ATP zu generieren: Die im Zytoplasma stattfindende Glykolyse und die in den Mitochondrien ablaufende Zellatmung. Der Seahorse-XF-Analyzer (Seahorse Bioscience, USA) ermöglicht eine standardisierte, nichtinvasive und indirekte Messung beider Stoffwechselwege von Zell- oder Organkulturen in Echtzeit. Das folgende Kapitel beschreibt die theoretischen Grundlagen dieser Messmethode.

Gemessen werden Veränderungen der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR, eng. oxygen consumption rate) und der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR, eng. Extracellular acidification rate) im Medium in unmittelbarer Nähe der Zellproben. OCR wird in Picomol pro min und ECAR in Milli-pH pro min angegeben. Im Laufe des Experiments wird der Energiestoffwechsel der Organkulturen durch nacheinander erfolgende Medikamentengaben beeinflusst. Aus der Reaktion des Gewebes lassen sich wiederum mitochondriale und glykolytische Funktionen berechnen. Abbildung 10 stellt schematisch eine Zelle und die beiden ATP-regenerierenden Stoffwechselwege des Menschen sowie deren indirekte Messmethoden durch den Seahorse-XF24-Extracellular-Flux-Analyzer dar:

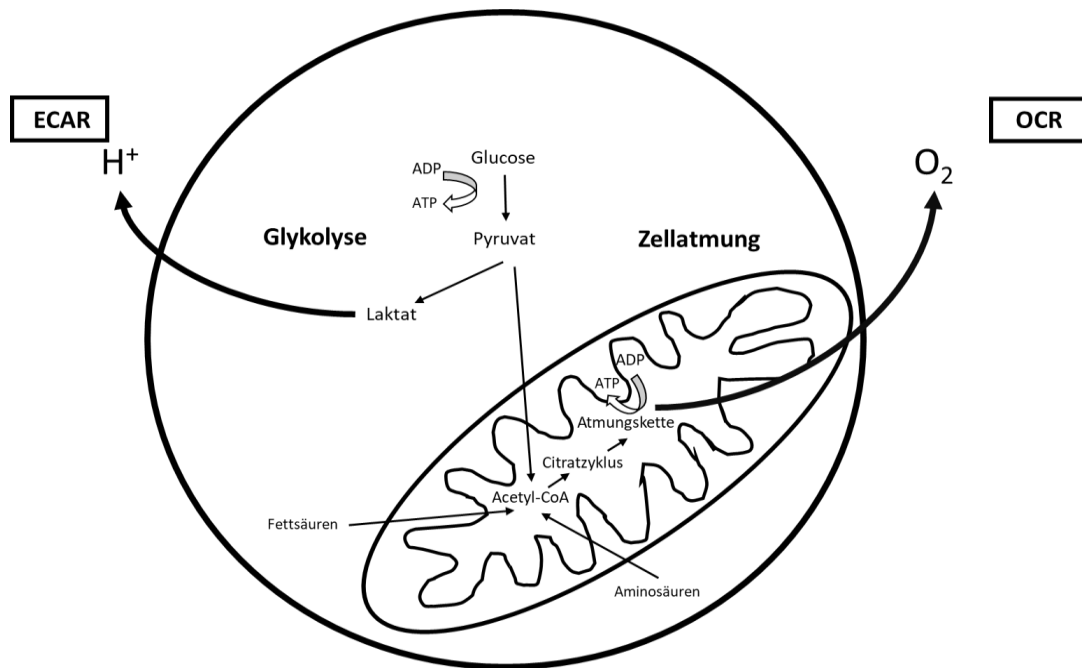


Abbildung 10 Die Extrazelluläre Ansäuerungsrate (ECAR) und Sauerstoffverbrauchsrate (OCR): Die ECAR gibt Aufschluss über den glykolytischen Umsatz der Zelle im Zytosol. Die OCR lässt Rückschlüsse auf die mitochondriale Aktivität zu; Quelle: modifiziert nach⁽³⁵⁾

2.7.1 Die untersuchten mitochondrialen Funktionen

Ziel der OCR-Messung ist die indirekte Messung der mitochondrialen Aktivität des RPE-Gewebes. Im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung wird Sauerstoff im vierten Redoxkomplex der Atmungskette verbraucht. Eine Änderung der Sauerstoffverbrauchsrate zeigt somit eine proportional veränderte Regeneration von ATP in den Mitochondrien an⁽¹³⁾. Für die Messung der OCR wurden nacheinander die Wirkstoffe Oligomycin, FCCP, Antimycin A und Rotenon appliziert. Diese Substanzen wirken jeweils an unterschiedlichen Stellen der Atmungskette. Diese Wirkorte sind in Abbildung 11 dargestellt. Oligomycin hemmt die ATP-Synthase. FCCP entkoppelt die oxidative Phosphorylierung, indem es den Transport von Protonen durch die innere Mitochondrienmembran in die Mitochondrienmatrix ermöglicht. Rotenon hemmt die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und Antimycin inhibiert die Oxidation des als Coenzym Q bekannten Ubichinon und verhindert so die Elektronenübertragung auf Cytochrom c⁽¹³⁾.

Die Auswertung der Reaktion des Gewebes auf die Wirkstoffe erlaubt einen standardisierten Vergleich der mitochondrialen Funktionen basale Zellatmung, ATP-abhängige Zellatmung, maximale Zellatmung sowie dem Protonenleck. Diese sind grafisch in Abbildung 12 dargestellt und werden nachfolgend kurz genauer erläutert.

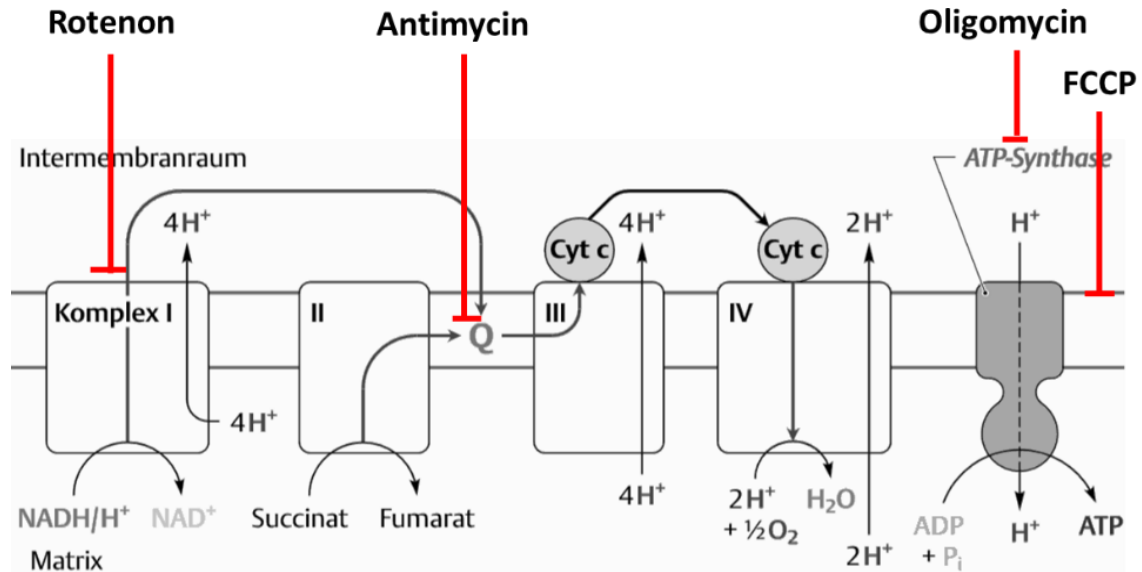


Abbildung 11 Molekulare Wirkorte in der Atmungskette der Im Rahmen der OCR-Messung verwendeten Medikamente; Quelle: modifiziert nach⁽⁶⁴⁾

Basale Zellatmung: Unter der basalen Zellatmung versteht man das Maß an Zellatmung einer Zelle in Ruhe. Die basale Zellatmung wird gebildet aus der Zellatmung, die notwendig ist, um den Grundbedarf der Zelle an ATP zu decken (ATP-abhängige Zellatmung) und der Zellatmungsaktivität, welche die Effekte des Protonenleck-Effektes (s.u.) ausgleicht⁽¹³⁾.

Protonenleck: Alle natürlichen Prozesse, die dazu führen, dass Protonen aus dem Zwischenmembranraum an der ATP-Synthase vorbei, zurück in die Mitochondrienmatrix fließen, werden als Protonenleck zusammengefasst. Dies bewirkt eine starke Reduktion des Wirkungsgrads der mitochondrialen Zellatmung. Das Ausmaß des Protonenlecks ist stark gewebespezifisch und steigt bei erhöhter mitochondrialer Aktivität exponentiell an⁽³⁸⁾.

ATP-abhängige Zellatmung: Der Anteil der Zellatmung, um den die basale Zellatmung nach Zugabe von Oligomycin zurückgeht, wird als ATP-abhängige Zellatmung bezeichnet. Diese ist beeinflusst von dem ATP-Bedarf, der ATP-Synthesefähigkeit sowie der Substrat- und Sauerstoffversorgung der Zelle. Das Verhältnis zum Protonenleck lässt sich nach Zugabe der Substanzen Rotenon und Antimycin A im letzten Experimententeil beurteilen, welche die Elektronentransportkette bereits zu Beginn unterbrechen⁽¹³⁾.

Maximale Zellatmung: Viele Zellen verfügen über die Fähigkeit, das Maß der Zellatmung bei Bedarf deutlich zu erhöhen. Um die maximale Leistung der Atmungskette der Zelle zu

provozieren, wurde der als Entkoppler wirkende Wirkstoff Trifluormethoxyphenylhydrazonmalononitril (FCCP) verwendet. Entkoppler werden Substanzen genannt, die in der Lage sind, durch Protonentransport aus dem Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix, die Elektronentransportkette und ATP-Synthese kurzzuschließen. Durch den Abfall des Protonengradienten im Intermembranraum verringert sich die protonenmotorische Kraft, welche die Komplexe der Atmungskette überwinden muss. Zusätzlich kommt es durch den Wegfall einer negativen Rückkopplung der Atmungskette durch eine erhöhte ADP- und erniedrigte ATP-Konzentration in der Zelle zu einer rasanten Beschleunigung der Prozesse der Atmungskette zwischen Komplex I bis IV. Dies erhöht die Sauerstoffverbrauchsrate entsprechend. Die maximale Zellatmung ist mit anderen Worten ein induziertes Protonenleck. Die ATP-abhängige Zellatmung bricht zusammen^(13, 58).

Respiratorische Reserve: Die respiratorische Reserve wird definiert als die Differenz zwischen dem höchsten Wert der maximalen Zellatmung und dem höchsten Wert der basalen Zellatmung. Die Bestimmung der Respiratorischen Reserve zusätzlich zur maximalen und basalen Zellatmung gibt keine neuen Informationen, sondern setzt beide Funktionen nur zueinander in Verhältnis. Daher wird sie im Ergebnisteil dieser Studie nicht einzeln aufgeführt, jedoch in der Diskussion der Ergebnisse besprochen.

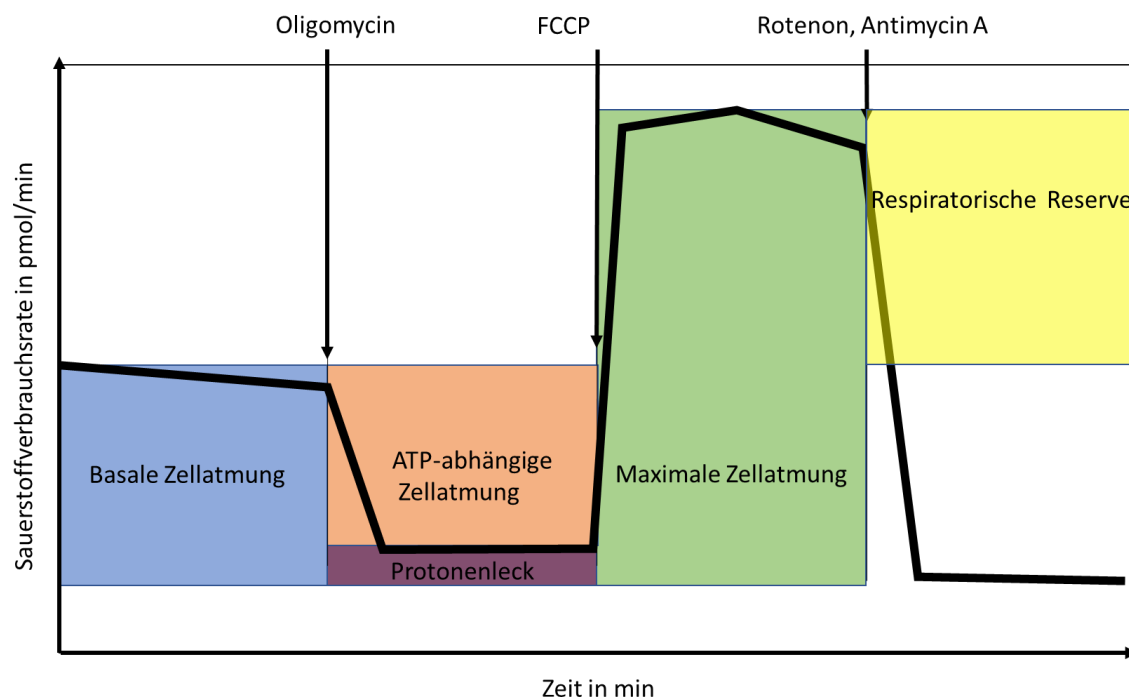


Abbildung 12 Beispielhafte OCR-Verlaufskurve einer OCR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyser nach Applikation der Wirkstoffe Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A aufgetragen auf die Zeit und schematische Darstellung der daraus errechenbaren mitochondrialen Funktionen Basale Zellatmung, ATP-abhängige Zellatmung, Maximale Zellatmung und Protonenleck; Quelle: modifiziert nach⁽²⁾, S. 6

2.7.2 Die untersuchten glykolytischen Funktionen

Der ECAR misst indirekt den glykolytischen Umsatz der Zelle. Bei der vollständig im Zytosol stattfindenden Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat abgebaut. Pyruvat ist das Anion der Brenztraubensäure, welches mit einem pKS von 2,5 als starke Säure gilt. Unter Sauerstoffverbrauch kann Pyruvat im Mitochondrium im Rahmen der Zellatmung vollständig zu Wasser und Kohlendioxid oxidiert werden. Kohlendioxid liegt in wässriger Umgebung als Kohlensäure (pKS= 6,1) vor, welche zu Bikarbonat dissoziiert und im Organismus einen wichtigen Puffer darstellt. Findet die Glykolyse unter anaeroben Bedingungen statt, wird das Pyruvat zu Laktat reduziert. Laktat ist das Anion der Milchsäure. Diese ist mit einem pKS von 3,9 weniger sauer als Brenztraubensäure oder Kohlensäure⁽³³⁾. Während beim vollständigen, aeroben Glukoseabbau im Mitochondrium etwa 32 ATP-Moleküle gewonnen werden können, sind es beim anaeroben Glukoseabbau netto zwei ATP-Moleküle. Beide Stoffwechselreaktionen finden immer in einem bestimmten, gewebespezifischen Verhältnis statt⁽³³⁾. Obwohl sowohl die anaerobe Glykolyse als auch die oxydative Phosphorylierung den pH-Wert des Extrazellularraumes senken, geschieht dies, relativ betrachtet, in unterschiedlichem Ausmaß. Unter aeroben Bedingungen, also mittels oxidativer Phosphorylierung, gewinnt die Zelle etwa sechzehnmal so viele ATP-Moleküle wie unter anaeroben Bedingungen. Der ATP-Bedarf der Zelle bleibt aber unabhängig von der Form der ATP-Gewinnung konstant.

Daraus lässt sich ableiten, dass wenn für ein ATP-Molekül, welches unter anaeroben Bedingungen entsteht, ein Proton anfällt, während für ein ATP-Molekül, welches unter aeroben Bedingungen entsteht, lediglich ca. 0,18 Protonen entstehen⁽¹³⁾. Mit anderen Worten fallen im Extrazellularraum von Zellen, die für die Energiegewinnung nicht auf die sauerstoffabhängige oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien zurückgreifen können, etwa fünf Mal so viele Protonen an, als bei Zellen, welche dazu in der Lage sind. Auf diesem Verhältnis basiert die Messmethode der ECAR-Messung.

Analog zur OCR-Messung werden die Gewebeproben während einer ECAR-Messung in regelmäßigen, zeitlichen Abständen mit den Substanzen behandelt, welche in charakteristischer Art und Weise auf den Energiestoffwechsel der Zellen wirken. Diese sind der Einfachzucker D-Glukose, der ATP-Synthaseinhibitor Oligomycin und das Glukoseanalogon 2-Desoxy-D-Glukose (2-DG). Hierdurch lassen sich die glykolytischen Funktionen basale Glykolyserate, glykolytische Kapazität und glykolytische Reserve bestimmen⁽¹³⁾. Diese sind grafisch in Abbildung 13 dargestellt.

Basale Glykolyserate: Das Gewebe wurde zum Zeitpunkt der ersten Messung eine Stunde in Medium ohne Glukose inkubiert. Das Hinzugeben hochkonzentrierter Glukose in den

Mediumüberstand erhöht den glykolytischen Umsatz auf das zum Überleben notwendige Maß. Die Zellen können zusätzlich zu Glykolyse noch ATP durch die oxidative Phosphorylierung gewinnen⁽¹³⁾.

Glykolytische Kapazität: Die oxidative Phosphorylierung wird anschließend mit der Zugabe von Oligomycin inhibiert. Um dies auszugleichen, steigt im Rahmen des Pasteur-Effekts der glykolytische Umsatz stark an. Dabei erreicht er seine theoretisch maximale Auslastung, welche man als Glykolytische Kapazität bezeichnet. Diese lässt sich durch die Zugabe des Glukoseanalogons 2-DG darstellen. Das Molekül hemmt den zweiten Schritt der Glykolyse kompetitiv, wodurch der Kohlenhydratabbau einbricht⁽¹³⁾.

Glykolytische Reserve: Aus der Differenz zwischen der basalen Glykolyse und der Glykolytischen Kapazität ergibt sich die Glykolytische Reserve. Diese sagt aus, wie stark die Zelle den glykolytischen Umsatz bei Bedarf steigern kann⁽¹³⁾.

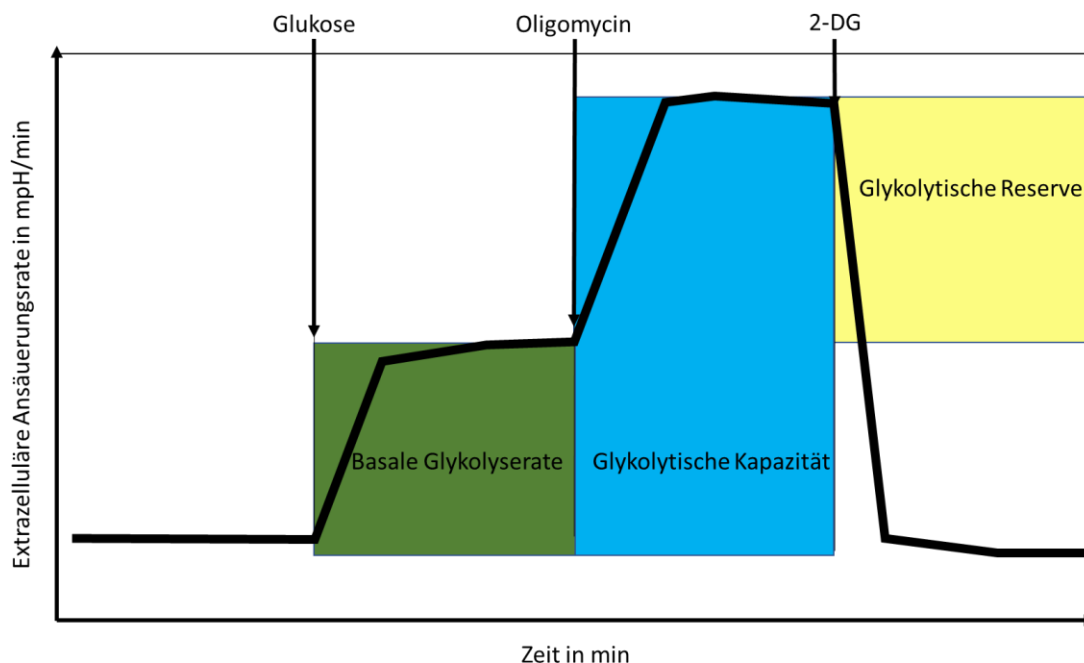


Abbildung 13 Beispielhafte ECAR-Verlaufskurve einer ECAR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyzer nach Applikation der Wirkstoffe D-Glukose, Oligomycin und 2-DG aufgetragen auf die Zeit und schematische Darstellung der daraus errechenbaren glykolytischen Funktionen basale Glykolyserate, glykolytische Kapazität und Glykolytische Reserve; Quelle: modifiziert nach Agilent Technologies:⁽⁴⁾ S. 7

Die in Abbildung 12 und 13 dargestellten OCR- und ECAR-Kurvenverläufe basieren auf Ergebnissen, welche Nicholls et. al. 2010 im Auftrag von Seahorse Bioscience bei Experimenten zur Standardisierung der Seahorse-XF-Analyzer-Messungen an verschiedenen Zelltypen erhob⁽⁶¹⁾. Die mitochondrialen und glykolytischen Funktionen sind jedoch hochgradig gewebespezifisch.

2.8 Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy (FLIO)

Die Messung der FLD von Gewebe weist gegenüber der Messung der Fluoreszenzintensität eine Reihe von Vorteilen auf. Eine Methode, die FLD einer Vielzahl von unterschiedlichen Gewebetypen zu untersuchen, ist die Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (FLIM). Sie ermöglicht hierdurch die Messung von feinsten metabolischen Veränderungen, wie der Sauerstoffsättigung, pH-Wert oder Proteinbindungsstatus in lebendem Gewebe, welche pathologischen Entwicklungen vorausgehen können. Darüber hinaus kann FLIM auch zur Untersuchung von Lagebeziehungen von Molekülen im Nanometerbereich eingesetzt werden⁽³⁰⁾.

Seit ihrer Entwicklung konnte die FLIM-Technologie für die Untersuchung einer Vielzahl von unterschiedlichen Gewebetypen spezialisiert werden. Als ersten für die FLT-Messung des menschlichen Augenhintergrundes konstruierte Apparat wurde 2002 von der Arbeitsgruppe um Dr. Dietrich Schweitzer an der Friedrich-Schiller-Universität Jena das Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskop (FLIO) entworfen⁽³⁰⁾. Der Augenfundus erschwert eine herkömmliche FLD-Messung durch unwillkürliche Augenbewegungen, eine hohe Sensibilität gegenüber hohen Beleuchtungsstärken und der unveränderbaren Positionierung hinter lichtbrechenden anatomischen Strukturen wie Cornea, Linse und Glaskörper⁽⁷¹⁾. Im Jahr 2010 wurde der Messapparat unter dem Namen Heidelberg Engineering Spectralis Scanner weiterentwickelt.

2.8.1 Aufbau und Funktion von FLIO

FLIO besteht aus einem gepulsten Anregungslaser, einem Eye-Tracking-System, zwei Photonendetektionskanälen und einem TCPSC-Modul. Abbildung 14 skizziert das verwendete System.

Bei dem Laser handelt es sich um einen konfokalen Diodenlaser (Becker & Hickl), der mit einer Pulsrepetitionsrate von 80 MHz und einer Leistung von 200 μ W Lichtsignale mit einer Wellenlänge von 473 nm aussendet⁽⁶⁹⁾. Die Lichtstärke des Laserstrahls wird vor dem Auftreffen auf dem Gewebe von einem Neutraldichtefilter herabgesetzt.

Am Augenfundus werden nun im Rahmen des Fluoreszenzprozesses Photonen emittiert, die ihrem auslösenden Lichtimpuls entgegen gerichtet sind und mittels Strahlteilern und Spiegeln zu den Photonendetektoren geleitet werden. Dabei wird es von einem Cut-Off-Filter von eventuell aufgetretener Lichtstreuung gereinigt. Zusätzlich verfügt das System über die Möglichkeit, Augenbewegungen nachzuverfolgen. Dazu wird dem Anregungslaser ein konfokaler Infrarotlaser mit einer Wellenlänge von 815 nm parallelgeschaltet. Dessen

Reflexionen auf der Hornhaut und deren Position zur Iris ermöglichen es mittels einer geeigneten Kamera, Positionsveränderungen wahrzunehmen und rechnerisch zu korrigieren, sodass jeder FLD-Messung auch nach einer Messung von 60 bis 120 Sekunden einer exakten Position auf dem Augenfundus zugeordnet werden kann⁽²¹⁾.

Die Detektion der emittierten Photonen basiert auf dem Prinzip der Zeitabhängigen Einzelphotonenmessung (TCSP, eng. time correlated single photon counting). Deren Funktionsweise ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Apparat gleicht einer im Pikosekundenbereich operierenden Stoppuhr: Startpunkt einer Messsequenz ist ein elektrisches Signal, welches bei jedem abgegebenen Laserimpuls erfasst wird. Dieses gilt als Referenz für das zeitverzögerte Eintreffen des ersten Fluoreszenzphotons, welches die Messsequenz beendet⁽²²⁾.

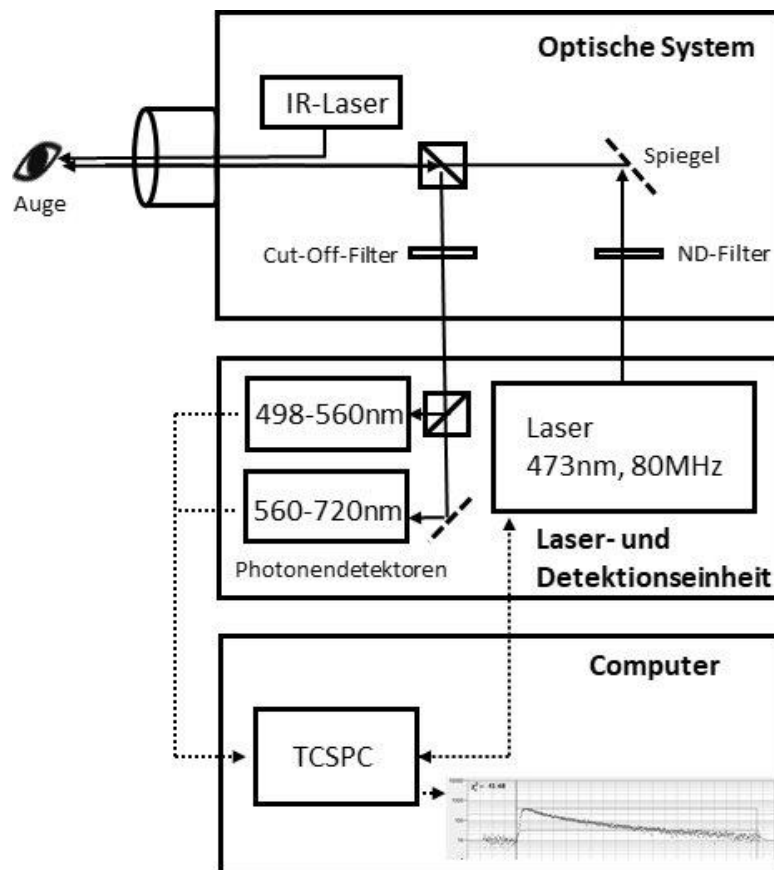


Abbildung 14 Der technische Aufbau von FLIO: Ein Laser mit einer Wellenlänge von 473nm fährt im Rasterverfahren den Augenfundus zeilenartig ab und provoziert dort Fluoreszenzsignale, die mit Hilfe von zwei Photonendetektoren (SSC 498-560 nm, LSC 560-720 nm) detektiert werden. Mittels eines Infrarotlasers können Augenbewegungen korrigiert und die Informationen einem konkreten Punkt auf dem Augenhintergrund zugeordnet werden. Ein TCSPC-Modul berechnet im Anschluss die Fluoreszenzzerfallskurve und mittlere FLD; Quelle: modifiziert nach⁽²¹⁾ S. 19

Es ist technisch im Moment nicht möglich, einen oft nur Pikosekunden andauernden Fluoreszenzzerfall Photon für Photon zu erfassen. Die Fluoreszenzzerfallskurven von biologischen Fluorophoren bestehen oft nur aus sehr wenigen Photonen. Die Wahrscheinlichkeit jedes dieser Photonen nachzuweisen ist in Hinsicht von vielfältigen Störphänomenen und der Totzeit der Photonendetektoren nicht gegeben. Dieses Problem wird dadurch begegnet, indem die Messung so lange wiederholt wird, bis mindestens 1000 Photonen pro Pixel ermittelt wurden.

Jede FLIO-Aufnahme wird in 256 x 256 Pixel unterteilt. Die emittierten Photonen werden dann entsprechend ihrer Detektionszeit in einem Histogramm erfasst. Dabei zeigt sich typischerweise ein stark exponentielles Wachstum der Fluoreszenz, gefolgt von einem unterschiedlich stark ausgeprägten exponentiellen Abfall^(22,78). Als Photonenzähler wurden HPM-100 hybrid detectors (Becker & Hickl GmbH, Berlin) verwendet. Diese erfassen Photonen über zwei separate Spektralkanäle, einen short spectral channel (SSC) mit einem Wellenlängenbereich von 498 nm bis 560 nm und einen long spectral channel (LSC) mit einem Wellenlängenspektrum von 560 nm bis 720 nm. Das TCSCP-Programm berechnet im Anschluss die Fluoreszenzzerfallskurven⁽¹⁹⁾.

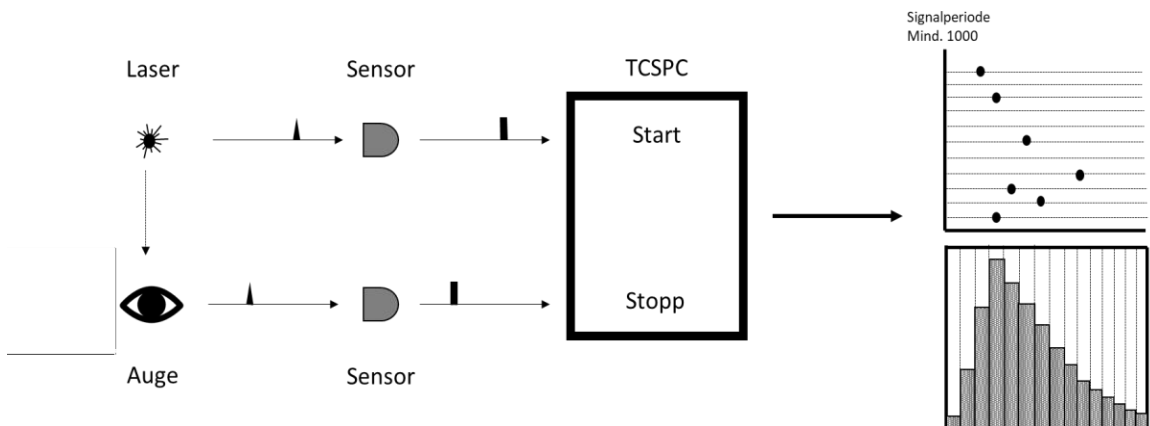


Abbildung 15 Funktionsprinzip des TCSPC: Durch die Verrechnung der exakten Zeitpunkte des Laserimpulses und der Detektion des emittierten Photons kann durch vielfache Wiederholung und Auftragen der Informationen in einem Histogramm eine Fluoreszenzabklingkurve ermittelt werden. Quelle: modifiziert nach⁽²²⁾

2.8.2 Bisherige Anwendungen von FLIO – in vivo

Um Erkenntnisse über die FLD des gesunden und an AMD erkrankten Augenfundus zu gewinnen, wurden eine Vielzahl von klinischen Studien in vivo, also am lebendigen Organismus, durchgeführt. Dabei konnten gut reproduzierbare FLD-Verteilungsmuster bestimmt werden⁽¹⁵⁾. Abbildung 16 zeigt beispielhaft FAF- und FLIO Aufnahmen von gesunden Probanden und AMD-Patienten.

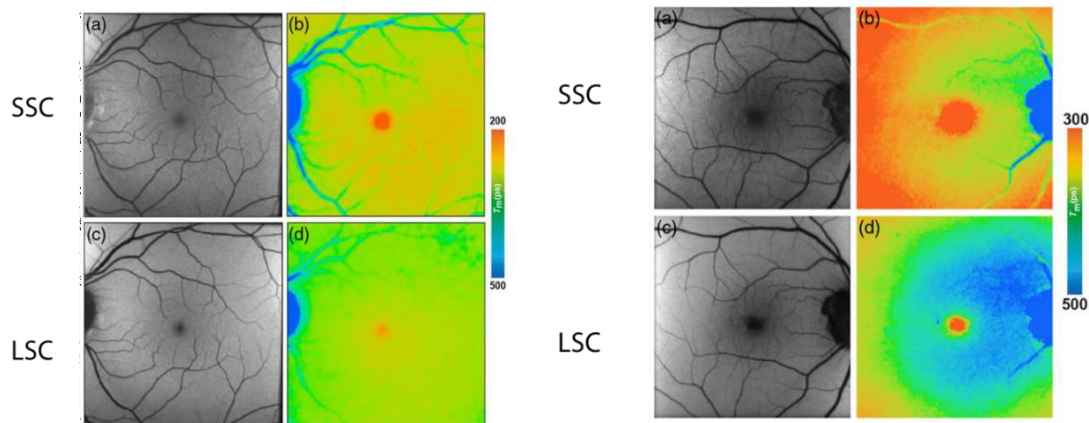


Abbildung 16 FAF- und FLIO-Bilder eines gesunden (links) und an AMD-erkrankten Auges (rechts) in den beiden Photonendetektionskanälen SSC und LSC; Quelle:⁽⁶⁹⁾, S 6 u. 8

Die kürzesten FLD in Augengesunden wurden im Bereich der fovea centralis detektiert. Dies wird mit den dort auftretenden hohen Mengen von Makulapigment erklärt. In Richtung der Netzhautperipherie werden dagegen verlängerte FLD gemessen. Am längsten ist die FLD im Bereich der retinalen Blutgefäße und der papilla nervi optici. Als Erklärung hierfür wird der dort vorhandene hohe Gehalt an Elastin und Kollagen angeführt⁽²⁰⁾. Während für das Geschlecht keinerlei Auswirkung auf die FLD nachgewiesen werden konnte, wird eine Verlängerung der FLD proportional zum Alter der Untersuchten beschrieben⁽⁶⁹⁾. Die mittlere FLD in der Makula von Patienten mit beginnender AMD ist generell deutlich verlängert. Diese Verlängerung lässt sich in einem ringförmig um die Makula verlaufenden Gebiet nachweisen und ist typischerweise im LSC am stärksten ausgeprägt⁽¹⁷⁾. Die Ursache hierfür wird diskutiert, doch erscheint ein Zusammenhang mit der bei einer AMD-Erkrankung erhöhten Ablagerung von Bisretinoiden in Form von Lipofuszin plausibel. Dieses Muster lässt sich auch in frühen Krankheitsstadien, also noch bevor mittels Ophthalmoskopie Drusen festgestellt werden können, nachweisen, obwohl hier die FLD-Verlängerung um die Makula weniger stark ausgeprägt ist⁽¹⁸⁾.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FLIO in der Lage ist, frühzeitig Veränderungen am Augenfundus zu detektieren, welche auf eine beginnende diabetische Retinopathie, einer häufigen Komplikation des Diabetes Mellitus, hinweisen⁽⁷⁰⁾. Anhand eines Knockout-Mausmodells, bei dem FLD-Messungen von zwei genetisch manipulierten Mausreihen, bei denen jeweils die Ausprägung eines für AMD-typischen Symptoms (Lipidakkumulation in der Bruchschen Membran, erhöhter oxidativer Stress) forciert wurde, mit FLD-Messungen an einem unbehandelten Wildtyp verglichen wurde, konnten beide metabolisch beeinträchtigten Mausreihen anhand der FLD-Messungen klar von dem gesunden Wildtyp unterschieden werden, noch bevor pathologische Veränderungen in FAF- oder OCT-Messungen auffällig wurden⁽⁵⁰⁾. Dies unterstützt die bisherigen Erkenntnisse, dass sich FLIO zur Detektion von Stoffwechselveränderungen der Netzhaut eignet.

2.8.3 Bisherige Anwendungen von FLIO – ex vivo

Mit der Bezeichnung ex vivo ist die Untersuchung von Geweben außerhalb des lebendigen Organismus gemeint. Bei ex-vivo FLIO-Messungen an Schweineaugen konnte eine im Gegensatz zu den in vivo Messungen am Menschen eine deutlich verlängerte mittlere FAD festgestellt werden⁽³¹⁾. Dies wurde mit der, aufgrund des jungen Schlachalters der Tiere geringen Lipofuszkonzentration des RPE, erklärt. Lipofuszin weist eine kurze FLD und eine hohe Fluoreszenzintensität auf. Daraus wurde geschlossen, dass die Untersuchungen am Schweineauge nützlich seien, um die Fluoreszenzeigenschaften von Fluorophoren neben Lipofuszin näher bestimmen zu können. Als den die Messung dominierenden Fluorophor wurde Melanin vermutet⁽³¹⁾. Durch die Auslösung von oxidativem Stress durch die Behandlung von ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten mit dem Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid, konnte mittels FLIO eine konzentrations- und expositionszeitabhängige Verlängerung der FLD erfasst werden, wobei die Veränderungen am deutlichsten am SSC hervortraten⁽⁵⁷⁾.

Zur Untersuchung der FLD- Entwicklung im Prozess der Wundheilung an porzinen ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten, wurde das RPE mit Hilfe eines Lasers irritiert. FLIO-Messungen direkt im Anschluss der Irritation ergaben eine stark verlängerte FLD im Bereich der durch den Laser zerstörten RPE-Zellen. Dies wurde mit einer Beeinflussung der Messung durch die an Elastin und Kollagen reiche Bruchmembran, welche sich hinter den RPE-Zellen befindet, erklärt⁽³⁷⁾. Im Gegensatz zur FAF-Messung konnte mittels FLIO um die Gewebsverletzung herum ein Bereich ausgemacht werden, der verglichen mit dem umliegenden Gewebe ebenfalls eine verlängerte FLD aufwies. Als eine anatomische Erklärung für dieses Phänomen wird die Verteilung von Melanin angeführt. Melanin weist eine vergleichbar kurze FLD auf und wird im Gewebe in Melanosomen gespeichert. Da deren Dichte in den neu gebildeten, deutlich vergrößerten RPE-Zellen jedoch niedrig ist, könnte dies zu der verlängerten FLD im betroffenen Gewebe führen. Andererseits könnte die verlängerte FLD auch auf metabolische Veränderungen im Gewebe hinweisen⁽³⁷⁾.

In den vergangenen Jahren konnten von unterschiedlichen Arbeitsgruppen vielversprechende Hinweise zusammengetragen werden, dass FLIO in der Lage ist Veränderungen des Energiestoffwechsels von RPE-Zellen zu detektieren. In den nachfolgenden Experimenten wurde anhand ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten versucht, die Frage zu beantworten, inwieweit sich eine AMD-assoziierte Autophagieinhibition auf den Energiestoffwechsel der RPE-Zellen auswirkt und ob und wie sich diese Veränderungen mittels FLIO darstellen lassen.

3 Material und Methoden

3.1 Gewinnung der ex-vivo-RPE/Choroidea-Explantate

Losgelöst aus ihrer physiologischen Umgebung, unterscheiden sich aus Stammzellen differenzierte, RPE-Zellen in-vitro in ihrem Verhalten und ihren Eigenschaften von RPE-Zellen in-vivo. Daher wurden bei den OCR-, ECAR und FLD-Messungen auf RPE-Organokulturen zurückgegriffen. Da humane Spenderaugen in Deutschland ausschließlich für die Hornhautspende vorgesehen sind, wurde eine bereits etablierte Methode zur Gewinnung von RPE/Choroid-Explantaten aus frischen Schweineaugen gewählt⁽⁴⁵⁾.

Bei der Verarbeitung der Schweineaugen wurde darauf geachtet, dass die Zeit zwischen E nukleation und Gewebegewinnung vier Stunden nicht überschritt. Lagerung und Transport erfolgten unter durchgängig kühlen und lichtgeschützten Bedingungen. Zu Beginn der Präparation wurden die Augen von Bindegewebe, Fett und Muskeln gesäubert und in einer Betaisodona-Lösung (Mundipharma GmbH, Germany; 1:4 verdünnt in destilliertem Wasser) für fünf min desinfiziert und anschließend in eine gekühlte, sterile phosphatgepufferte Salzlösung (Dulbeccos PBS, ohne Calcium und Magnesium, Sigma-Aldrich) überführt. Von nun an wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet, um eine Kontamination der Gewebeproben zu vermeiden.

Abbildung 17 veranschaulicht den nachfolgend beschriebenen Präparationsprozess der Explantate. Mit einem Skalpell wurde die Sklera etwa 5 mm hinter dem Rand der Iris eingeschnitten. Anschließend wurde der Schnitt mit Hilfe einer Schere kreisförmig fortgesetzt und so der vordere Teil des Auges abgetrennt. Um das anschließende Arbeiten zu erleichtern, wurde ein zur Papille weisender Keil aus dem Gewebe entfernt. Nun wurden die beiden Blätter der Retina, Bruch-Membran und Choroidea, vorsichtig mit einer feinen Pinzette gegriffen und durch leichten Zug und einer scharfen, chirurgischen Mikroschere von der Sklera getrennt und angehoben. Darunter wurde ein Fixationsring mit den Maßen 5 mm x 5 mm x 1 mm unter das Gewebe gelegt, sodass dieser vollständig bedeckt war. Der in der wissenschaftlichen Werkstatt der Universität zu Lübeck extra für diesen Zweck angefertigte Kunststoffring diente dabei als Träger für das Gewebe und gab diesem Stabilität. Daraufhin wurde die Neuroretina entfernt, in dem diese, im außerhalb des Ringes gelegenen Areal mit einer Pinzette ergriffen und vorsichtig abgezogen wurde. Nun konnte der Ring mit dem darüber gespannten Gewebe mit einer Mikroschere umschnitten und so mobilisiert werden^(54, 56).

Anschließend wurden die Gewebeexplantate in 499,5 µl Kulturmedium bei 5 % CO₂ und 37 °C unter statischen Bedingungen inkubiert. Die Stammlösung des verwendeten Kulturmediums bestand aus 439,5 ml hochglukosehaltigem DMEM (Dulbeccos modified Eagles Medium – high glucose, Sigma-Aldrich), einem standardisierten Kulturmedium, welches 4,5 g/L D-Glukose, anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine sowie Natriumpyruvat enthält und zusätzlich mit 50 ml Schweineserum, 5 ml Penicillin/Streptomycin und 5,5 ml Natriumpyruvat versetzt wurde.

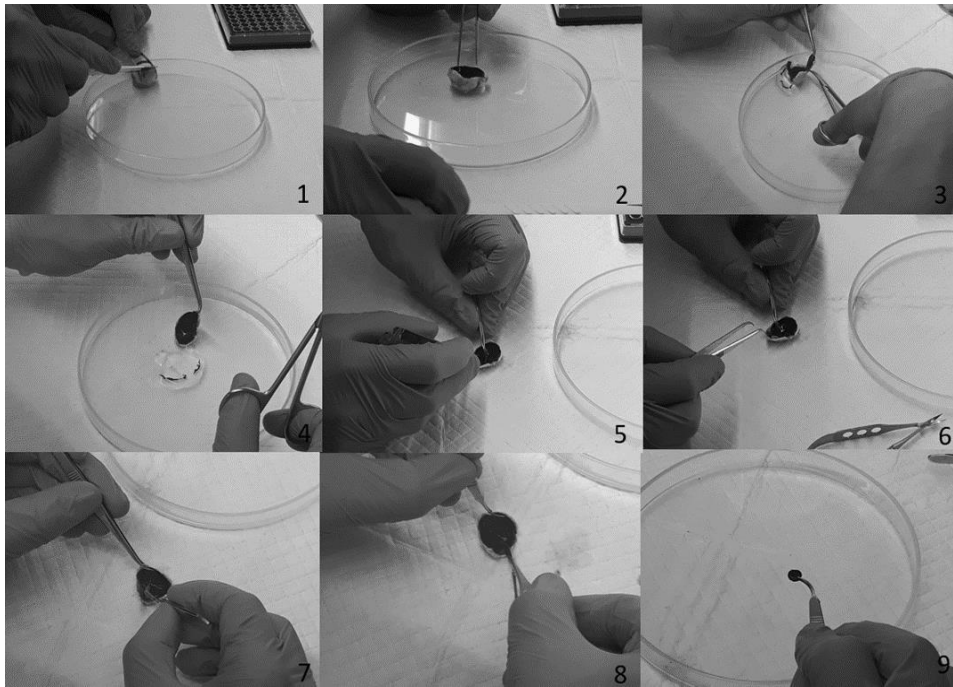


Abbildung 17 Bilderserie zum Ablauf der Präparation der RPE-Choroidea-Organkultur: Eröffnung des Augenninneren (1); Entfernung des vorderen Augenabschnitts (2); Entfernung eines zur Papille weisenden Keils (3); Entfernung des Glaskörpers (4); Anhebung der Retina, Bruchmembran und Choroidea (5); Unterlegung des Fixationsringes (6); Entfernung der Neuroretina (7); Mobilisierung des Fixationsringes mitsamt des darüber gespannten Gewebes (8,9); Quelle: eigene Aufnahmen

3.2 Behandlung der Explantate mit Bafilomycin A1

Mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 (Cayman Chemicals) und dem organischen Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde eine 1×10^{-5} M Stammlösung angesetzt.

In allen nachfolgenden Experimenten wurden 2 Gruppen unterschieden: Eine mit 1×10^{-8} M Bafilomycin A1 (0,5 µl Stammlösung in 499,5 µl Kulturmedium) behandelte Versuchsgruppe und eine mit 0,5 µl DMSO versetzte Kontrollgruppe. Diese Konzentration basiert auf dem Ergebnis von Kaußler, welches zeigt, dass die 24-stündige Inkubation von RPE/Choroidea-Explantaten mit 1×10^{-8} M Bafilomycin A1 im Vergleich zu nur mit DMSO behandelten Zellen keine signifikante Zunahme des Zelltods zur Folge hat⁽⁴²⁾.

3.3 Vitalitätstest mittels Calcein-AM

Um den Lebendzellanteil der ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate zu prüfen, wurde ein Zellvitalitätstest mittels Calcein-AM (Thermo-Fisher-Scientific) durchgeführt. Dieses Molekül wird im Inneren von lebenden Zellen durch zelleigene Enzyme unter Abspaltung der Acetoxymethylgruppe in Calcein umgewandelt⁽⁷⁶⁾. Calcein ist in der Lage, Calciumionen zu komplexieren, wobei es bei einem Anregungswellenlängenmaximum (λ_{ex}) von 494 nm eine intensive, grüne Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum von 517 nm aufweist⁽⁷⁷⁾. Nekrotische Zellen dagegen verbleiben ohne dieses Fluoreszenzsignal, da ohne die zelleigenen Enzyme die Aktivierung von Calcein-AM nicht stattfinden kann.

Die Explantate wurden mit PBS gewaschen und mit je 1 ml einer 5 μ M Calcein Arbeitslösung für 15 min im Brutschrank inkubiert. Hierfür wurden jeweils 5 μ l einer 1 mM Stammlösung in 995 μ l Kulturmedium verdünnt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut mit PBS gespült. Daraufhin wurden die Proben mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Eclipse-Ti-E, Nikon) unter zehnfacher Vergrößerung mit FITC-Filter (λ_{ex} = 465 nm – 495 nm) untersucht.

Zur Auswertung der im Calcein-Test erlangten RPE-Aufnahmen wurde das Bildbearbeitungsprogramm Fiji (Image J) genutzt. Hierfür wurden die als JPEG-Dateien gespeicherten Aufnahmen zunächst in 32-Bit-Graustufenbilder umgewandelt. Flächen, die auf den Aufnahmen schwarz erscheinen, entsprechen dem Anteil nekrotischer Zellen. Dies ist in Abbildung 18 beispielhaft dargestellt. Mithilfe einer Schwellenwertanalyse wurde der prozentuelle Anteil dieser Flächen bestimmt.

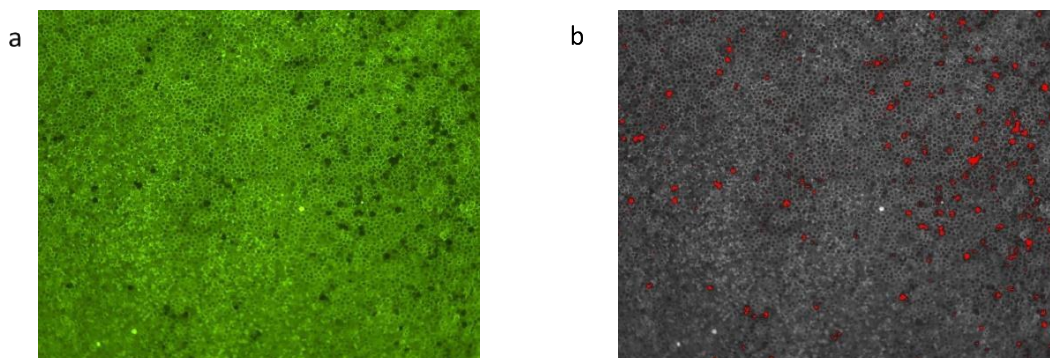


Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopiebild von mit Calcein gefärbten RPE-Zellen: a: lebendige Zellen nehmen Calcein-AM auf und fluoreszieren in grüner Farbe; tote Zellen erscheinen schwarz; b: Zur grafischen Auswertung wurden die Fotos in einen 8-bit Datentyp umgewandelt und mittels einer Schwellenwertanalyse untersucht; (x10 Vergrößerung); Quelle: Eigene Aufnahmen

3.4 Autophagieinhibitionsnachweis von Bafilomycin A1

Die autophagiehemmende Wirkung von Bafilomycin A1 wurde mittels einer Messung der Autophagosomenanzahl validiert. Hierfür wurde ein unter der Bezeichnung „Autophagy-Assay-Kit“ (Sigma Aldrich) vertriebenes Testsystem verwendet⁽⁷²⁾.

Für den Versuch wurden ex-vivo Gewebeproben von einem Zentimeter Durchmesser angefertigt, die aus dem RPE, der Choroidea sowie der darunter befindlichen Sklera bestanden. Diese Gewebeproben wurden in einer 24-well-Zellkulturplatte in 1 ml Kulturmedium bei 5 % CO₂ bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Hälfte der insgesamt 24 Zellproben wurde mit 1x10⁻⁸ M Bafilomycin A1 behandelt, während die andere Hälfte mit DMSO in entsprechendem Volumen versetzt wurde.

Die über Nacht inkubierten Explantate wurden mit PBS gespült und mit einem „Autophagosom-Marker“ (Eigenentwicklung des Herstellers, detaillierte Information geschützt) entsprechend den Angaben des Herstellers für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Explantate zweimal mit PBS gespült. Mittels eines Spektrofluorometers (SpectraMax M4 Multi-Mode Mikroplatten Reader) wurde die Fluoreszenzintensität ($\lambda_{ex}=333$ nm/ $\lambda_{em} = 518$ nm, Cutoff bei 515 nm) bestimmt. Die so ermittelte Fluoreszenzintensität (in relativen Fluoreszenzeinheiten RFU) soll die Menge der intrazellulären Autophagosomen widerspiegeln. Bafilomycin A1 verhindert, wie in Abbildung 19 dargestellt, die Fusion der Autophagosomen und Lysosomen. Eine signifikant erhöhte RFU lässt sich somit als Nachweis der Wirksamkeit des Medikaments interpretieren.

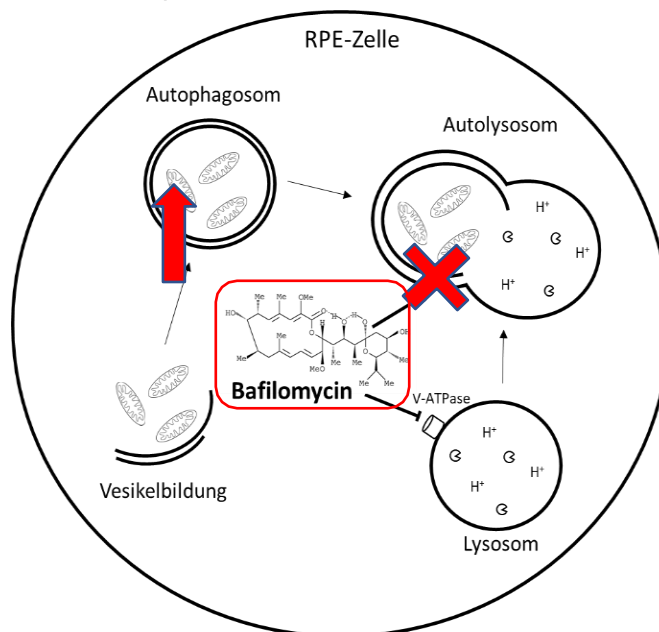


Abbildung 19 Schema der Wirkmechanismen von Bafilomycin A1 auf den Prozess der Makroautophagie: Durch die Hemmung der Bildung von Autolysosomen durch den Wirkstoff, steigt die Anzahl der Autophagosomen in den Zellen; Quelle: modifiziert nach⁽⁴⁸⁾

3.5 OCR/ECAR-Messungen

Der Seahorse-XFe24-Extracellular-Flux-Analyzer (Agilent) erlaubt durch Messung von OCR und ECAR die Beurteilung des Energiestoffwechsels von unterschiedlichem Gewebe. Abbildung 20 stellt das Messprinzip dar. Für eine Messung werden eine für diesen Zweck vertriebene Organkultur-, Kalibrations- und Sensorplatte benötigt.

Die Sensorplatte, welche auf die Gewebeprobe enthaltende Organkulturplatte gesteckt wird, verfügt pro Vertiefung über Sauerstoff- und pH-Wert-spezifische Fluorophore. Diese werden über ein Lichtwellenleitersystem aus Fiberglas angeregt (OCR: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 532 nm / 650 nm; ECAR: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 470 nm / 530 nm). Das daraus resultierende Fluoreszenzsignal wird von hochsensitiven Photodetektoren erfasst und computergestützt ausgewertet. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass Schwankungen der Sauerstoff- und Protonenkonzentration Auswirkung auf das emittierte Fluoreszenzsignal haben.

Energiestoffwechseländerungen lassen sich mit bis zu vier Substanzen provozieren, die über Injektionsports der Sensorplatte zu vorher definierten Zeitpunkten nacheinander in die darunterliegenden Mikrokammern appliziert werden können. Die Substanzen werden im Anschluss mehrere min im Medium vermischt. Im Anschluss senkt sich die Sensorplatte wieder die Messposition und verharrt so lange, bis eine Veränderung der OCR oder ECAR über einen Schwellenwert hinaus registriert wird. Nun fahren die Sensoren wieder in die Grundposition zurück und der Prozess wiederholt sich. Hierdurch kann der Energiemetabolismus der Zellen im zeitlichen Verlauf dokumentiert werden⁽⁶¹⁾.

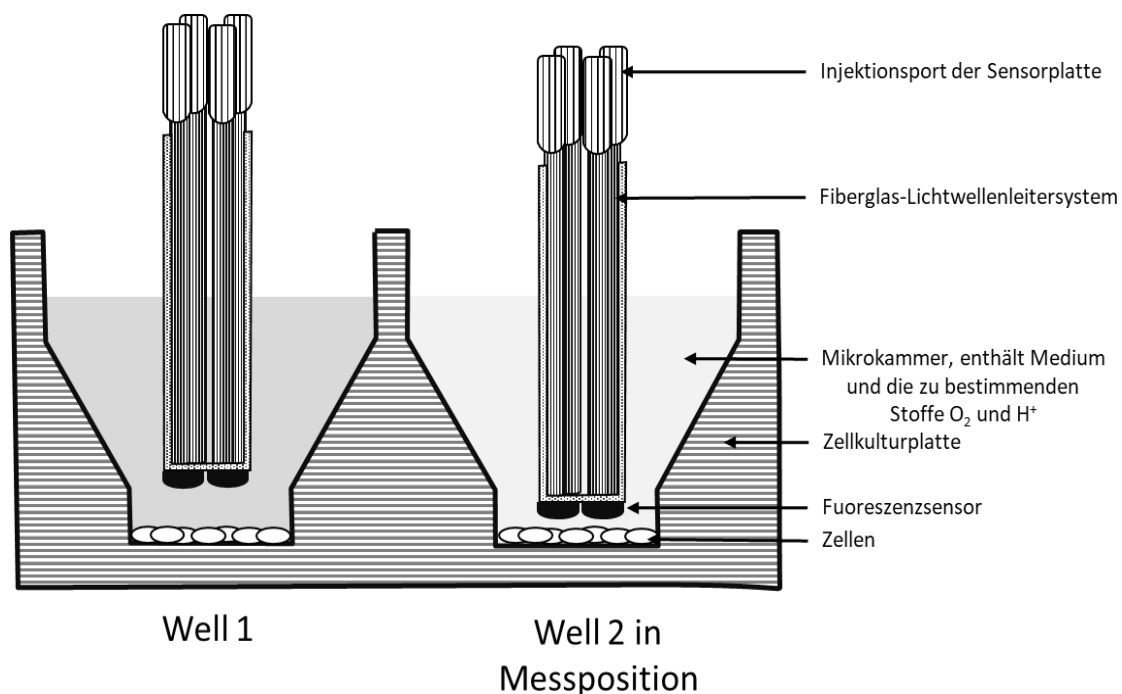


Abbildung 20 Messprinzip des Seahorse-XF-Analyzers; Quelle: modifiziert nach ⁽³⁾, S. 4

Bei dem Seahorse XF-Analyser handelt es sich um eine etablierte Methode zur Evaluierung des Energiemetabolismus von Zell- und Organkulturen. Seit seiner Entwicklung im Jahr 2006 wurde die Methode in über 5000 Publikationen an den verschiedensten Zellarten eingesetzt⁽³⁶⁾. Obwohl die zugrundeliegenden Wege der Zellen, Energie in Form von ATP zu erzeugen, in jedem Gewebe gleich sind, wurde bei den verschiedenen untersuchten Zellarten ein bemerkenswertes Maß an Heterogenität der Energiestoffwechselfparameter festgestellt⁽¹³⁾.

3.5.1 Etablierung der OCR/ECAR-Messungen von ex-vivo RPE/Choroidea - Explantaten

Da bisher noch keine Stoffwechselanalyse an ex-vivo RPE-Gewebe mittels Seahorse XF Analyzer durchgeführt wurde, musste die Explantatgewinnung für diesen Zweck adaptiert werden: Der Durchmesser der Explantate wurde an die Größe der Vertiefungen, der für die Stoffwechselanalyse mit Seahorse verwendeten 24-well-Mikrotiterplatte, angepasst. (Vgl. Abbildung 21) Es zeigte sich, dass sich die Explantate während des Misch- und Messprozesses des Seahorse-XF-Analyzers, um die eigene Achse zu drehen schienen, was das Messergebnis beeinträchtigte. Um diesem Problem entgegenzuwirken, wurden von Agilent bereitgestellte Islet-Netze mittels des speziell dafür bereitgestellten „Seahorse Capture Screen Insert Tools“ vorsichtig auf die Organkulturen aufgelegt. Durch die Verwendung des Islet-Netzes konnten stabile Messergebnisse erzielt werden.

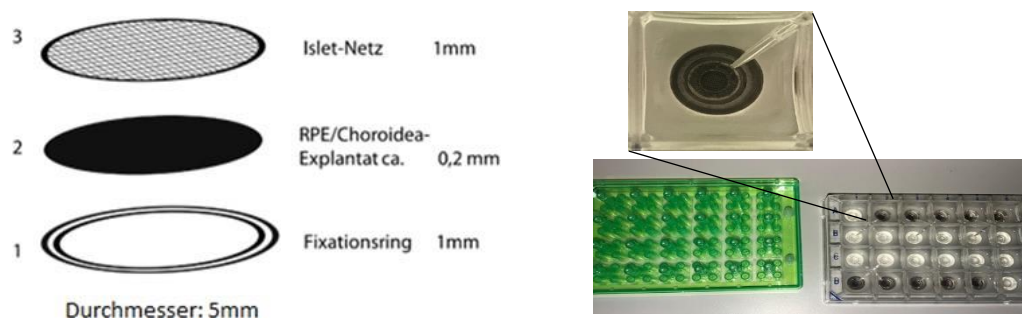


Abbildung 21 Der Aufbau der verwendeten ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate: links: Diese bestehen aus den drei Komponenten Fixationsring (1), RPE/Choroidea-Explantat (2) und Islet-Netz (3); rechts: Die Sensor- und Zellkulturplatten des „Seahorse-XF-Assay-Kits“: Für die Stoffwechselfmessungen wurden Explantate in die oberste und unterste Reihe der Zellkulturplatte plziert; Quelle: eigene Aufnahme

3.5.2 Durchführung der OCR-Messung

Für die OCR- und ECAR-Messungen wurde das „Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit“ bzw. das „XF Glycolysis Stress Test Kit“ (Seahorse Bioscience) verwendet. Bei der Durchführung und Auswertung der Versuche wurde sich an den von Seahorse Bioscience für den jeweiligen Versuch bereitgestellten Laborprotokollen, des von Nicholls et. al. für den Seahorse XF Analyzer standardisierten Experiments zur Energiestoffwechselanalyse von Zellen orientiert⁽²⁾.

Kalibration: Am Tag vor der Messung musste das System kalibriert werden. Dafür wurde die vom Hersteller bereitgestellte Kalibrationsplatte vorbereitet, indem in jede Vertiefung 1 ml des ebenfalls bereitgestellten Seahorse-XF-Kalibrationsmedium über Nacht ohne CO₂ bei 37 °C inkubiert wurde.

Vorbereitung der OCR-Messung: Die ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate wurden, wie in Kapitel 3.1 beschrieben, am Tag 1 gewonnen. Am Tag 2 wurde das für die OCR-Messung vorgesehene Medium (Sigma DMEM D5030, 4,5 g/l Glukose, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamax) des Seahorse XF Cell Mito Stress Test-Kits vorbereitet, auf 37 °C erwärmt und auf einen pH-Wert von 7,4 ± 0,1 eingestellt. Die Gewebeproben wurden zweimal mit 600 µl Versuchsmedium gespült. Nach der letzten Waschung verblieben 525 µl Versuchsmedium in den Vertiefungen. Die Zellkulturplatte wurde im Anschluss für eine Stunde bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert.

Messung der OCR: Im Verlauf der OCR Messung wurden die Substanzen Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A nacheinander in die Vertiefungen appliziert. Die finalen Konzentrationen dieser Wirkstoffe sind Tabelle 2 zu entnehmen. Die Substanzen wurden als Lösung des Versuchsmediums mit einem Gesamtvolumen von 75 µl in die jeweiligen Injektionsports gefüllt. Im Anschluss daran wurden Zellkultur- und Sensorplatte für weitere 10 min bei 37 °C ohne CO₂ inkubiert.

Tabelle 2 Wirkstoffkonzentrationen der OCR-Messung

Injektionsport	Wirkstoff	Konzentration in µM	Funktion
A	Oligomycin	4 µM	ATP-Synthasehemmer
B	FCCP	0,6 µM	Entkoppler
C	Rotenon/Antimycin A	5 µM	Komplex I/III-Hemmer

3.5.3 Durchführung der ECAR-Messung

Die Durchführung der ECAR-Messung war analog zur OCR-Messung. Die Messvorgänge unterschieden sich in folgenden Punkten: Als Versuchsmedium wurde Sigma DMEM D5030, versetzt mit 3,97 mM L-Glutamin, verwendet. Der pH-Wert wurde auf $7,35 \pm 0,05$ eingestellt. Die Wirkstoffe, mit welchen die Injektionsports für die ECAR-Messung befüllt wurden, sind mit ihren jeweiligen Endkonzentrationen in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3 Wirkstoffkonzentration der ECAR-Messung

Injektionsport	Wirkstoff	Konzentration in μM	Auswirkung
A	D-Glukose	50 mM	Glykolysesubstrat
B	Oligomycin	4 μM	ATP-Synthasehemmer
C	2-DG	100 mM	Glukoseanalogon

3.5.4 Berechnung der mitochondrialen und glykolytischen Funktionen

Ein Messvorgang endete nach insgesamt 277 min. In dieser Zeit erfolgten 33 Einzelmessung alle acht bis neun min. Diese wurden abhängig vom Zeitpunkt der Wirkstoffgabe in vier Experimentphasen eingeteilt:

Phase 1 - Messzeitpunkte 1 - 6; 1. bis 44. min

Phase 2 - Messzeitpunkte 7 – 15; 53. bis 122. min

Phase 3 - Messzeitpunkte 16 – 24; 131. bis 200. min

Phase 4 - Messzeitpunkte 25 – 33; 208. bis 277. min

Während der ersten Versuchsphase wurde die Energiestoffwechsellistung der Zellen ohne zusätzliche Wirkstoffe untersucht. Zu den Messzeitpunkten 6, 15 und 24 wurden nacheinander die Ports A bis C in die Vertiefungen der Zellkulturplatte entleert und mit dem darin enthaltenden Medium vermischt. Aus den gemessenen OCR und ECAR ließen sich im Anschluss die in 2.7.1 und 2.7.2 beschriebenen mitochondrialen und glykolytischen Funktionen berechnen.

Als Differenz vom letzten Wert der ersten Experimentalphase und des Minimalwertes der vierten Experimentalphase der OCR-Messung wurde die basale Zellatmung errechnet. Die ATP-abhängige Zellatmung ist die Differenz des letzten Wertes der ersten Experimentalphase und des Minimalwertes der zweiten Experimentalphase. Die maximale Zellatmung ist Differenz des Maximalwertes von Phase drei und des Minimalwertes von Phase vier.

Das Protonenleck wird berechnet durch Subtraktion des Minimalwertes von Phase 2 und des Minimalwertes von Phase vier. Die Reservekapazität ist die Differenz des Maximalwertes der dritten Phase und des letzten Wertes der ersten Phase⁽¹³⁾.

Die basale Glykolyserate wird ermittelt durch den Abzug des letzten Wertes der ersten Versuchsphase vom Maximalwert der zweiten Versuchsphase der ECAR-Messung. Die glykolytische Kapazität ist Differenz des Maximalwerts der dritten Versuchsphase und der vierten Versuchsphase und bei der glykolytischen Reserve handelt es sich um die Differenz des Maximalwertes der dritten Versuchsphase und der zweiten Versuchsphase⁽¹³⁾.

3.6 Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLD)

Das nachfolgend vorgestellte Experiment hatte das Ziel, die FLD des RPEs der ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate unter Autophagieinhibition mittels FLIO zu bestimmen und diese mit einer Kontrollgruppe zu vergleichen. Mit der Autophagieinhibition wurde versucht, ein wesentliches Merkmal der Pathophysiologie einer AMD-Erkrankung des Gewebes zu simulieren.

3.6.1 Etablierung der Messung der FLD von ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten mittels FLIO

Für die FLD-Messung musste zuerst der FLIO-Aufbau so modifiziert werden, dass eine Messung an der horizontalen Fläche einer schwarzen 96-Mikrotiterplatte, in der die Organokulturen inkubiert wurden, möglich war. Hierzu wurde der standardisierte FLIO-Versuchsaufbau verändert, indem ein 50,8 mm x 50,8 mm großer Spiegel (Thorlabs) so befestigt wurde, dass die horizontalen Laser- und Lichtsignale im rechten Winkel reflektiert wurden (Abbildung 21). Die Anfertigung und Montage der Halterungen für Objektisch und Spiegel geschah erneut mit Hilfe der Wissenschaftlichen Werkstatt der Universität zu Lübeck.

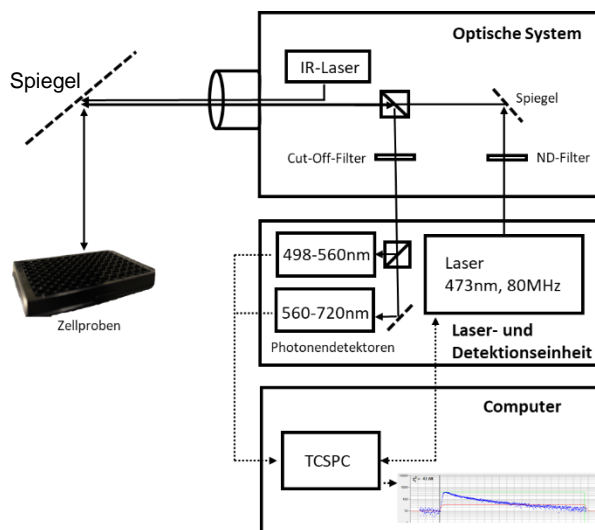


Abbildung 22 Modifizierung des Versuchsaufbaus von FLIO durch Positionierung eines Spiegels: links: technische Skizze; Quelle: modifiziert nach⁽²¹⁾ S. 19; rechts: Der FLIO-Versuchsaufbau bestehend aus einem optischen System (1), Spiegel (2) und Objektisch mit Mikrotiterplatte (3); Quelle: eigene Aufnahme

3.6.2 Durchführung der FLD-Messungen

Gemessen wurde mittels FLIO die FLD von gemäß Kapitel 3.1 gewonnenen RPE-Explantaten, welche anteilig für 24h mit 1×10^{-8} M Bafilomycin A1 oder DMSO behandelt wurde. Diese Explantate befanden sich zum Messzeitpunkt in den Vertiefungen einer horizontal auf dem Objektisch befestigten 96-Mikrotiterplatte und wurden von 200 μ l desselben Mediums bedeckt, welches für die OCR-Messung verwendet wurde (Sigma DMEM D5030, 4,5 g/l Glukose, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamax). Um den Einfluss der Linsenkrümmung des für die Untersuchung des menschlichen Auges konstruierten optischen Systems von FLIO gering zu halten, wurde nur ein kleiner, zentraler Bereich von ca. 18 mm x 18 mm vermessen. Somit wurde pro Einzelmessung die FLD von vier Gewebeproben bestimmt.

Zu Beginn des Experiments wurde sichergestellt, dass der Raum maximal verdunkelt war, um die Messung nicht zu beeinträchtigen. Die 96-Mikrotiterplatte, in der die Zellproben inkubiert wurden, wurde auf dem Objektträger positioniert. An Objektträger und Spiegelhalterung wurden die eingestellten Positionen markiert, um gleiche Bedingungen für Wiederholungen des Experiments an unterschiedlichen Tagen zu gewährleisten. Das Bild wurde mit einem Fokus von 9 dpt scharf gestellt. Da sich die Entfernung der Explantate nicht veränderte, blieb diese Einstellung zwischen den Messungen unverändert. Der Neutraldichtefilter wurde auf 100 % eingestellt. Eine einzelne FLD-Messung dauerte pro Vertiefung ca. 90 s – 120 s und wurde so lange durchgeführt, bis an beiden Spektralkanälen an allen Pixelpositionen einer Zellprobe mindestens 1000 Photonen detektiert wurden

3.6.3 Auswertung der FLD-Messungen

Für die Auswertung der gemessenen Daten wurde die Software SPCLmage (Becker & Hickl GmbH) verwendet. Diese berechnet die mittlere FLD (τ_m) für den gesamten Messbereich für jeden der beiden Photonendetektionskanäle aus den Komponenten τ_1 und τ_2 mit den jeweils korrespondierenden Amplituden α_1 und α_2 nach folgender Formel:

$$\tau_m = \frac{\tau_1 \times \alpha_1 + \tau_2 \times \alpha_2}{(\alpha_1 + \alpha_2)}$$

Um die räumliche Verteilung der so gewonnenen FLD-Daten darzustellen, werden diese mit Hilfe einer Farbcodierung auf eine Darstellung des Augenfundus übertragen, wobei eine kurze FLD meistens mit der Farbe Rot und eine lange FLD mit der Farbe Blau gekennzeichnet wird. Alle in der Software vorgenommenen Einstellungen und Arbeitsschritte sind dem entsprechenden Auswertungsprotokoll im Anhang zu entnehmen.

Abbildung 22 zeigt das SPCLmage-Interface einer exemplarischen FLD-Messung. Gezeigt werden die Autofluoreszenzintensitätsaufnahmen der vier pro Messung erfassten Organ-kulturen, die farbcodierte FLD und ein Graph, welcher die Messungen der Photonenzähler darstellt. Die blauen Markierungen zeigen die detektierten Photonen an, die auf der X-Achse in Abhängigkeit ihrer Detektionszeit aufgetragen werden. Die grüne Kurve entspricht der IRF, einer gerätespezifischen Konstante und die rote Kurve einer angenäherten Fluoreszenzabklingkurve. Der χ^2 -Wert gibt Aufschluss über die Qualität der Annäherung. Es wurde ein biexponentielles Fittingmodell verwendet. Über den binning factor lassen sich hierfür Photonen benachbarter Pixel zusammenfassen. Es wurde ein bin von 1 verwendet. Inwieweit die angenäherte Abklingkurve den tatsächlichen gemessenen Photonenzzeitpunkten entspricht, wird mittels einer Chi-Quadrat-Verteilung angegeben und sollte etwa 1 entsprechen. Die τ_m -Daten wurden anschließend als ASC-Dateien in das Bildbearbeitungsprogramm Fiji importiert. Mit Hilfe eines kreisförmigen Auswahlwerkzeugs ließen sich die Flächen der einzelnen Gewebeproben auswählen (Abbildung 23). Es wurde darauf geachtet, dass der Flächeninhalt der Auswahl gleich groß war. Der Mittelwert dieser Flächeninhalte entspricht der mittleren FLD des jeweiligen untersuchten Ex-plantats. Analog konnten so die mittleren Komponenten t_1 und t_2 sowie α_1 und α_2 bestimmt werden.

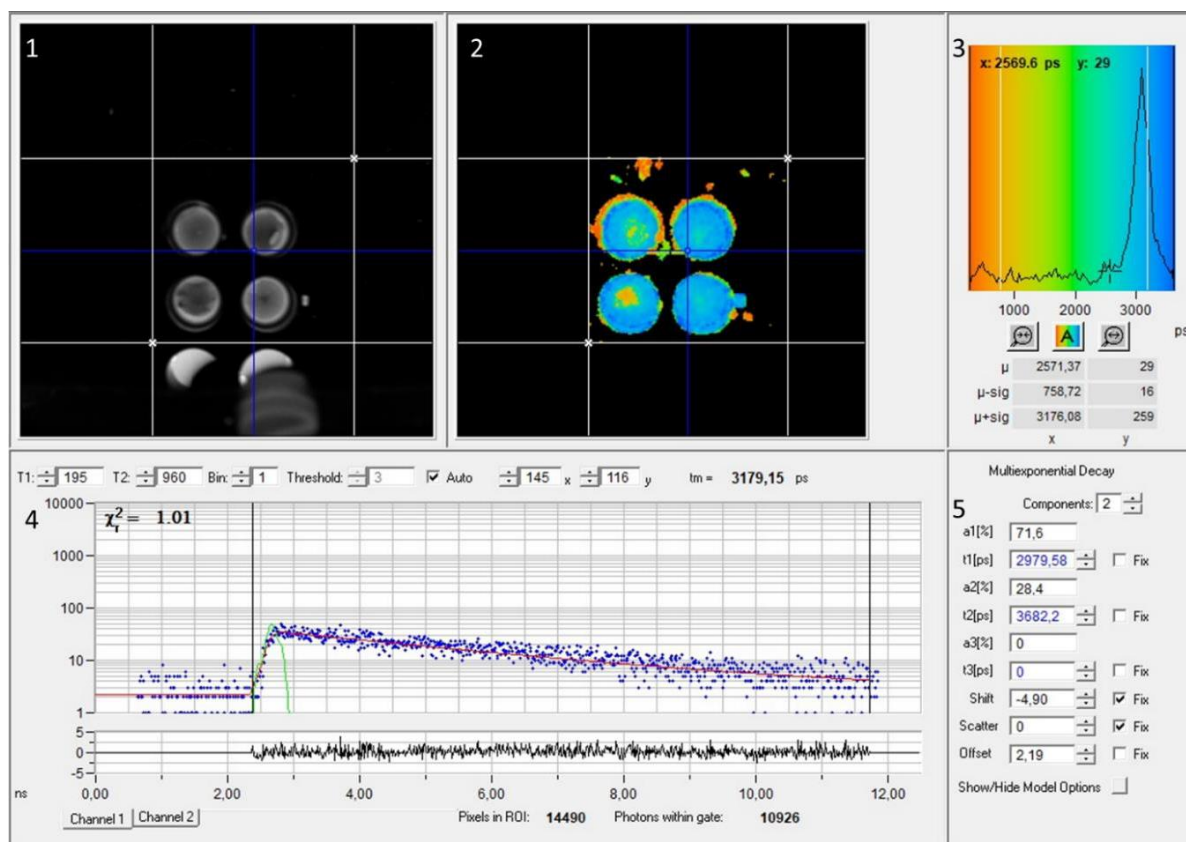


Abbildung 23 Screenshot der FLIO-Analysesoftware SPCImage: 1: Autofluoreszenzintensität; 2: FLD; 3: Legende der FLD-Farbcodierung; 4: Fit-Parameter 5: Einstellungen zu den Komponenten und Amplituden, Quelle: eigene Aufnahme

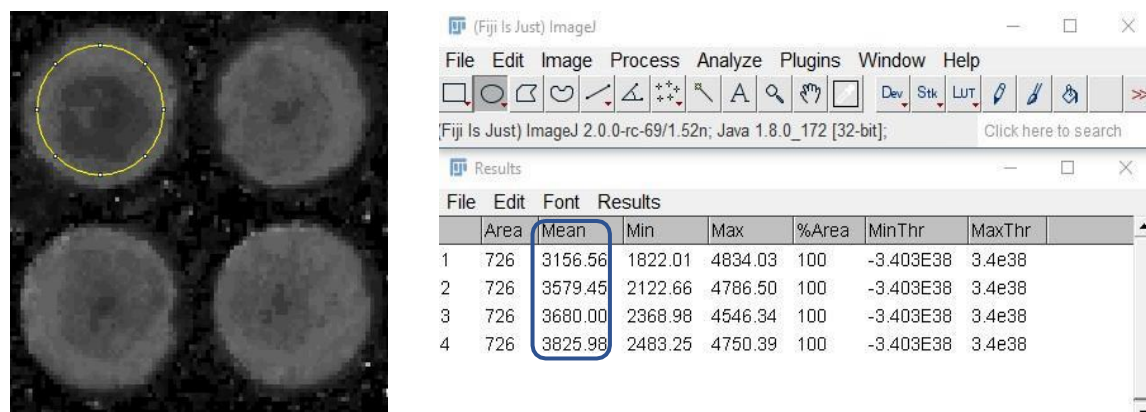


Abbildung 24 Screenshot des Bildbearbeitungsprogramms Fiji: Auswahlwerkzeug (gelb); berechneter Mittelwert der ausgewählten Fläche (blau) Dieser entspricht der mittleren FLD, Quelle: eigene Aufnahme

3.7 Statistische Methoden

Die ermittelten Daten des Calcein- und Autophagietests sowie der OCR- und ECAR-Messung wurden mit dem Statistikprogramm GraphPad PRISM (Version 7.01) analysiert. Dies umfasst die Ermittlung von Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung. Im Text werden Ergebnisse zumeist als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mittels FLIO wurde die mittlere FLD, τ_m , der Explantate, sowie deren kurze und lange Komponente τ_1 und τ_2 und der jeweiligen Amplitude α_1 und α_2 , für beide Spektralkanäle ermittelt.

Zu Beginn wurden als Bedingung einer Anwendbarkeit des Welch-Tests alle Daten mittels D'Agostino-Pearson-Tests auf Normalverteilung überprüft. Um die Mittelwerte der Kontroll- und Experimentalgruppe auf signifikante Verschiedenheit zu überprüfen, wurde ein t-Test durchgeführt. Da beide Gruppen aufgrund der Vielfältigkeit des verwendeten biologischen Materials nicht miteinander verbunden oder voneinander abhängig sind, musste ein ungepaarter t-Test (Zweistichproben-t-Test) gewählt werden. Dabei konnte nicht von einer gleichen Varianz beider Gruppen ausgegangen werden, weshalb die Verwendung des sogenannten Welch-Tests entschieden wurde.

Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant unterschieden und mit einem Ausrichen * gekennzeichnet. Ab einem p-Wert von $p \leq 0,01$ spricht man von einem sehr signifikanten (**) und einem p-Wert von $p \leq 0,001$ (***) von einem höchst signifikanten Unterschied. Kann kein Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen nachgewiesen werden, wird dies mit n.s. oder Angabe des entsprechenden p-Werts gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Das Ziel der Studie war anhand von ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten Erkenntnisse über den Effekt einer Autophagieinhibition auf den Energiestoffwechsel und FLD von RPE-Zellen zu sammeln. Dafür wurden die RPE-Zellen mit dem Autophagieinhibitor Bafilomycin A1 (1×10^{-8} M, 24h) behandelt. Daraufhin wurde die Zellvitalität, die OCR und ECAR sowie die FLD untersucht. Die autophagiehemmende Wirkung von Bafilomycin wurde durch Bestimmung der Autophagosomenanzahl nachgewiesen.

4.1 Zellvitalitätstest mit Calcein-AM

Um den Anteil von abgestorbenen RPE-Zellen der ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten abschätzen zu können, wurde nach 24 h Inkubation ein Zellvitalitätstest mittels Calcein-AM durchgeführt. Die Bedingungen der Präparation entsprachen denen der im Folgenden vorgestellten Experimente. Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchsgruppe (1×10^{-8} M Bafilomycin) und Kontrollgruppe (DMSO) festgestellt werden. Daher wurde für die folgenden Versuche die Bafilomycinkonzentration von 1×10^{-8} M verwendet.

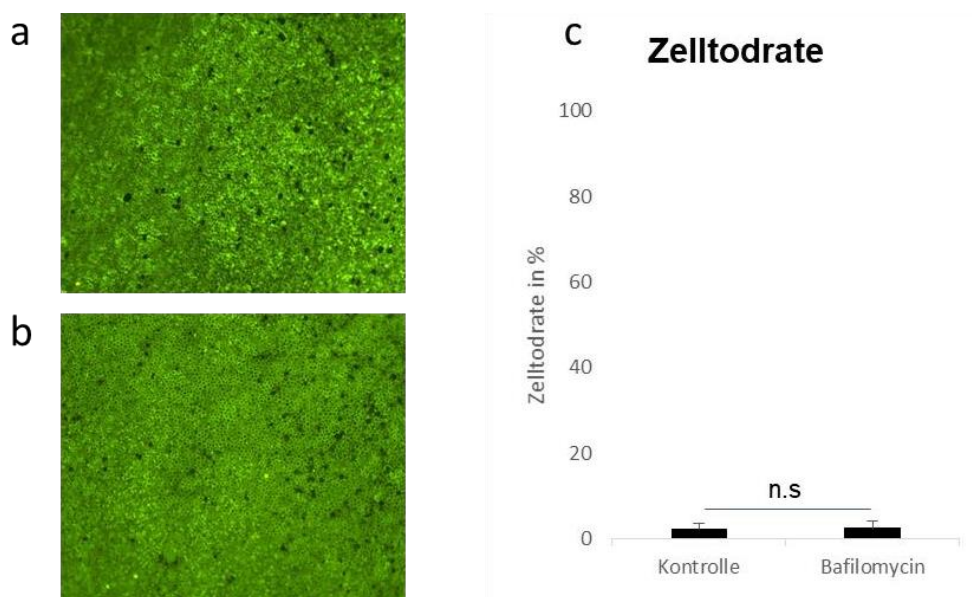


Abbildung 25 RPE-Zellvitalität: a) Beispielhaftes Bild der Fluoreszenzmikroskopie eines Calcein-Tests von unbehandelten RPE (DMSO; n=5), und b) mit 1×10^{-8} M Bafilomycin behandelte Gewebe (n=4); c) Prozentualer Anteil der avitalen RPE-Zellen in den Explantaten. Die Vitalität der RPE-Zellen beträgt in der Kontrollgruppe 2,1 % ± 1,5 % und der Versuchsgruppe 2,5 % ± 1,1 %; p= 0,72; Quelle: eigene Aufnahmen

4.2 Bestimmung der Autophagosomenanzahl

Zur Wirkungsvalidierung des Autophagiehemmers Bafilomycin A1 wurde ein für diesen Zweck vertriebenes „Autophagie-Testkit“ verwendet, welches auf der fluoreszenzbasierten Detektion von Autophagosomen beruht. Bafilomycin verhindert neben der Lysosomazidifizierung auch die Fusion der Lysosomen mit den Autophagosomen. Eine signifikant erhöhte Anzahl an Autophagosomen lässt sich daher als Wirksamkeitsnachweis des Medikaments deuten.

Wie Abbildung 25 aufzeigt, nahm die relative Fluoreszenzintensität der Explantate nach 24-stündiger Inkubation mit Bafilomycin A1 signifikant zu.

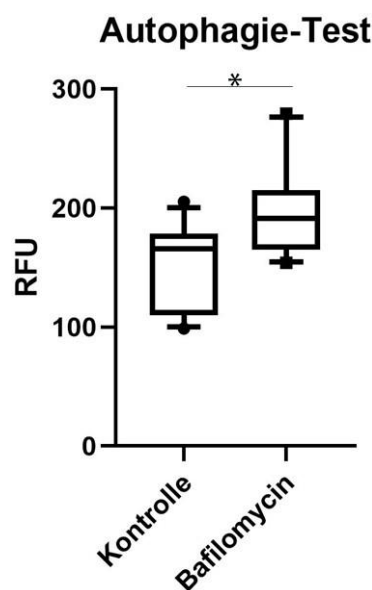


Abbildung 26 Wirkungsvalidierung des Autophagieinhibitors Bafilomycin A1: Die Autophagosomen der RPE-Zellen wurden mittels eines „Autophagy-Assay-Kit“ (Sigma Aldrich) fluoreszenzmarkiert. Das gemessene Fluoreszenzsignal wird in relativen Fluoreszenzeinheiten als Boxplot-Diagramm dargestellt. Abgelesen werden können die Maximalwerte (oberes Whiskerende), 75 %-Perzentile (oberes Boxende), 25 %-Perzentile (unteres Boxende) und Minimalwerte (unteres Whiskerende); * $p < 0,05$; n (Kontrolle)=11, n (Bafilomycin A1)=12

4.3 Messung der Sauerstoffverbrauchsrate (OCR)

Mit Hilfe des Seahorse-XF24-Analyser wurde die OCR als Ausdruck der mitochondrialen Aktivität der ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate untersucht. Abbildung 26 stellt die OCR der Explantate sowohl mit als auch ohne Autophagiehemmung durch Bafilomycin A1 (1×10^8 M, 24h) in ihrer zeitlichen Entwicklung und ihrer Abhängigkeit der in Kapitel 2.7.1 beschriebenen Medikamentengaben dar.

In Phase eins (I) wurde die OCR der RPE-Zellen in Ruhe gemessen. Zu Beginn von Phase zwei (II) wurde Oligomycin, zu Beginn der dritten Phase (III) FCCP und zu Beginn der vierten Phase (IV) Rotenon/Antimycin verabreicht.

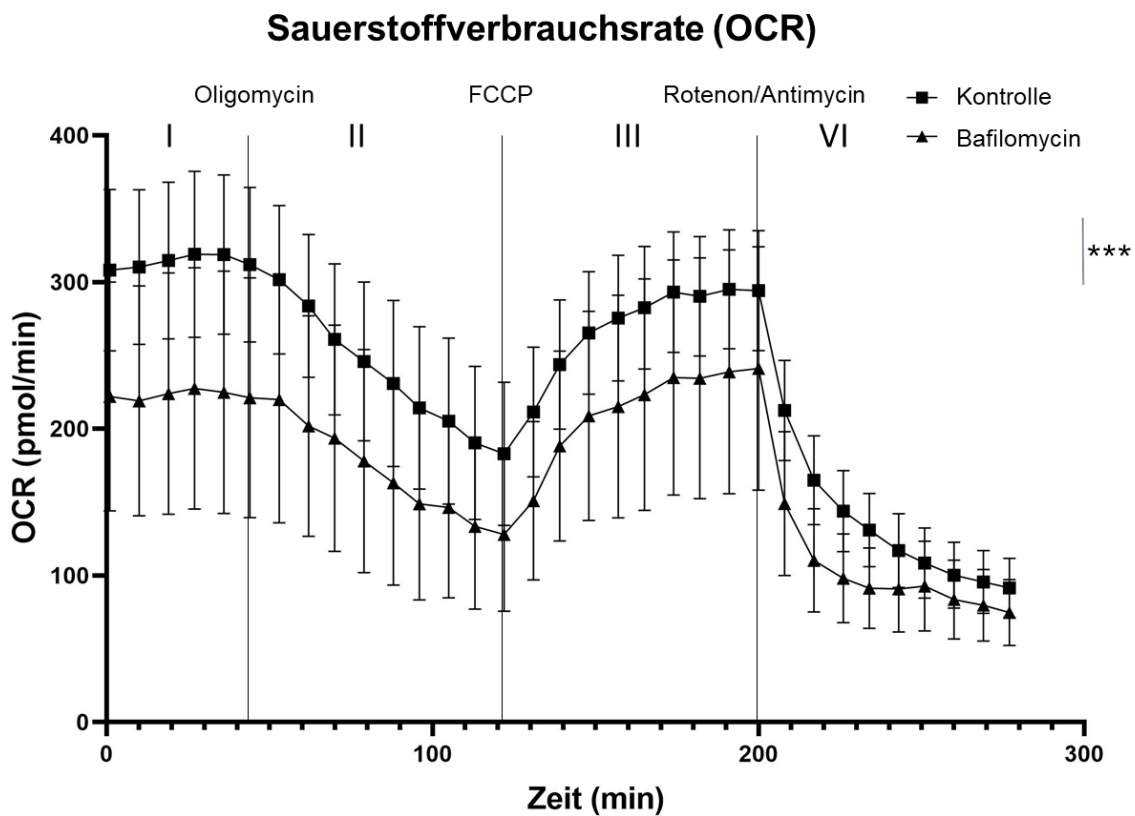


Abbildung 27 Messung der OCR in pmol/min im Verlauf der Zeit: gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung. Auf der x-Achse werden die Zeitpunkte für die Gabe der Zellatmungsmodulatoren Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A markiert, welche das Experiment in vier Phasen teilen, *** $p < 0,001$, n (pro Gruppe) = 15

Die OCR der Gewebeproben der Kontrollgruppe werden in der Abbildung mit Quadraten markiert, während die OCR der Explantate der Experimentalgruppe mit Dreiecken markiert sind. Die Kontrollgruppe weist eine mittlere Standardabweichung von 41,2 auf; die Experimentalgruppe dagegen eine mittlere Standardabweichung von 60,1.

In Phase 1 des Experimentes liegt die mittlere OCR der Kontrollgruppe bei 314 pmol/min \pm 4 pmol/min. Nach Zugabe von Oligomycin (ATP-Synthase-Hemmer) kommt es zu einem linearen Abfall der OCR auf einen Minimalwert von 183 pmol/min in der 122. min. Dies entspricht ca. 60 % der OCR in Ruhe. Nach Zugabe des Entkopplers FCCP steigt die OCR auf maximal 294 pmol/min in der 191. min und bleibt so hinter der mittleren OCR in Ruhe zurück. Nach Zugabe der beiden Atmungsketteninhibitoren Rotenon und Antimycin bricht der Sauerstoffverbrauch der Zelle deutlich ein und erreicht einen minimalen Wert von 91 pmol/min in der 277. min (ca. 30 % der OCR in Ruhe).

Die OCR der mit Bafilomycin A1 behandelten Experimentalgruppe entwickelt sich im Verlauf des Experiments simultan zu der der Kontrollgruppe, jedoch mit signifikant niedrigerer OCR. Die autophagieinhibierten Zellen verbrauchen zu Beginn der Messungen in Ruhe lediglich 223 pmol/min \pm 3 pmol/min Sauerstoff. Dieser Verbrauch fällt in der zweiten Phase des Experiments auf 127,9 pmol/min, steigt in der dritten Phase auf maximal 241,2 pmol/min und fällt schließlich in der vierten Phase auf 74,7 pmol/min. Die OCR der Experimentalgruppe erreicht im Verhältnis zu der Kontrollgruppe in Phase 1 und am Ende von Phase 2 in der 122. min ca. 70 % und an den Endpunkten von Phase 3 in der 200. min und Phase 4 in der 277. min ca. 80 %.

Mithilfe dieser Angaben lassen sich die in Abbildung 27 dargestellten weiteren mitochondrialen Funktionen bestimmen (Vgl. Kapitel 3.5.4): Die basale Zellatmung der lediglich mit DMSO behandelten Kontrollgruppe beträgt im Durchschnitt 220 pmol/min \pm 43 pmol/min, die ATP-abhängige Zellatmung beläuft sich auf 129 pmol/min \pm 46 pmol/min, die maximale Zellatmung auf 207 pmol/min \pm 36 pmol/min und das Protonenleck auf 94 pmol/min \pm 40 pmol/min. Die basale Zellatmung der Experimentalgruppe beträgt 147 pmol/min \pm 62 pmol/min, die ATP-abhängige Zellatmung 94 pmol/min \pm 48 pmol/min, die maximale Zellatmung 168 pmol/min \pm 60 pmol/min und das Protonenleck 54 pmol/min \pm 31 pmol/min.

Um die mittlere OCR beider Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde ein Welch-Test durchgeführt. Dabei konnte ein statistisch höchstsignifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p = 0,0006$). Dies gilt ebenfalls für den Vergleich der mitochondrialen Funktionen der basalen Zellatmung ($p = 0,001$). Der Unterschied im Ausmaß des Protonenlecks ist sehr signifikant ($p = 0,0055$).

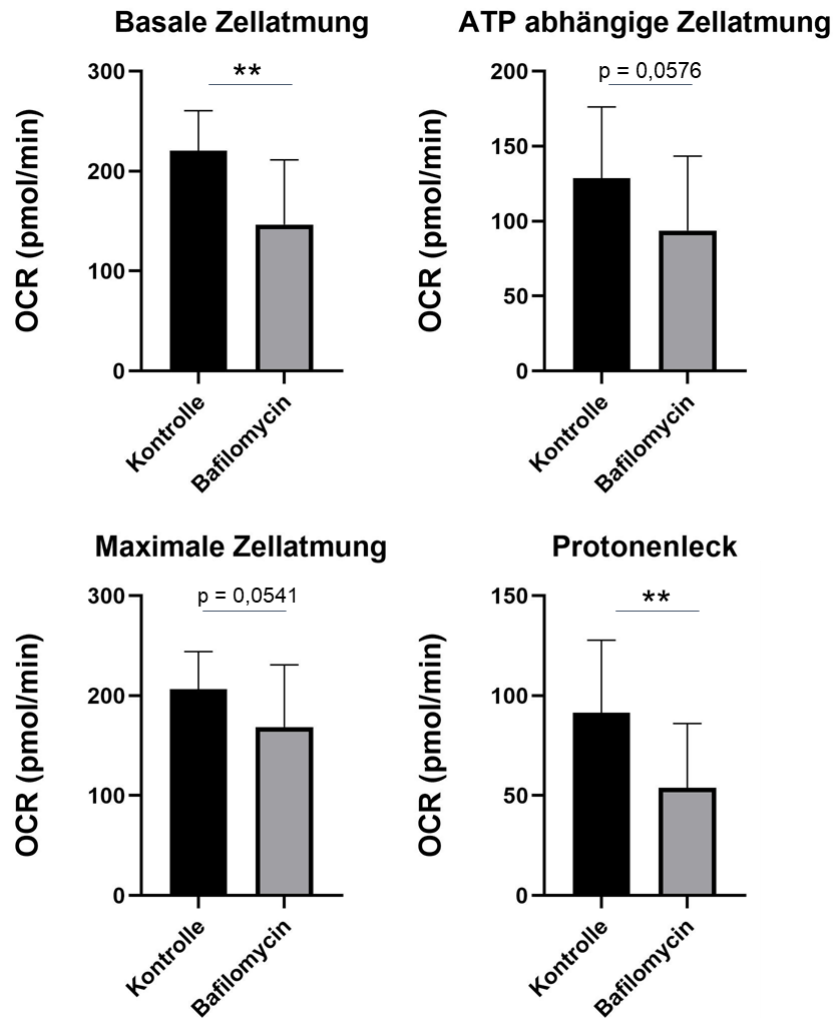


Abbildung 28 Vergleich der mitochondrialen Funktionen: errechnet aus den Ergebnissen der OCR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyzer; Unter Autophagieinhibition zeigten die Zellen eine hochsignifikant erniedrigte basale Zellatmung und Protonenleck. (** $p < 0,01$)

4.4 Messung der Extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR)

Zusätzlich zur Bestimmung des mitochondrialen Energiestoffwechselumsatzes, wurde die glykolytische Aktivität der Zellen untersucht. Hierfür wurde die ECAR als indirekter Nachweis des Ausmaßes der glykolytischen Aktivität der Explantate der Versuchs- und Kontrollgruppe mittels Seahorse XF Analyzer gemessen. Die Ergebnisse der ECAR-Messung sind in Abbildung 28 dargestellt.

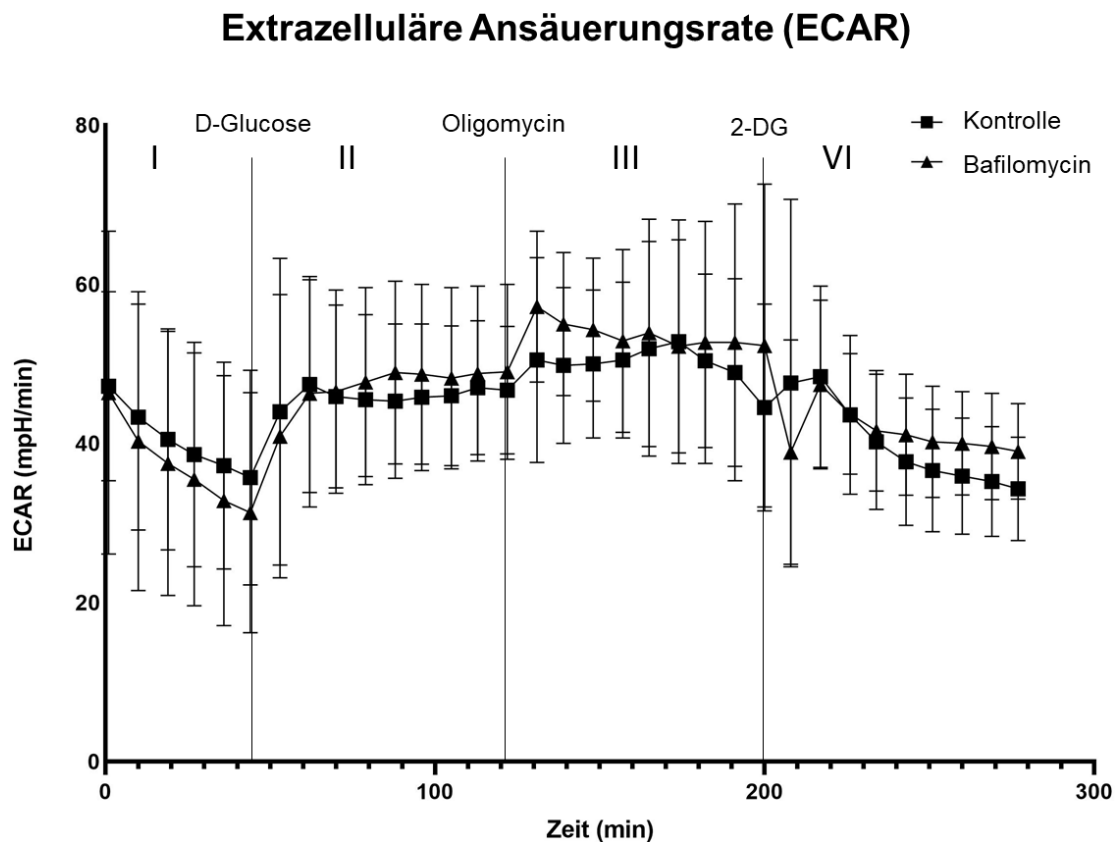


Abbildung 29 Messung der ECAR in pmol/min im Verlauf der Zeit: gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichung. Auf der x-Achse wurden die Zeitpunkte für die Gabe der Zellatmungsmodulatoren D-Glukose, Oligomycin und 2-DG markiert. n (pro Gruppe) = 12

Die ECAR der Explantate der Kontrollgruppe (DMSO) wird mit Quadraten, die ECAR der Explantate der Versuchsgruppe (24-stündige Inkubation mit 1×10^8 M Bafilomycin A1) mit Dreiecken dargestellt. Obwohl sich die Zellen in Ruhe befinden, kommt es in beiden Gruppen zu einem Abfall des pH-Wertes in Phase eins (I). In der Kontrollgruppe erfolgt dieser von $47,2 \text{ mpH/min} \pm 11,9 \text{ mpH/min}$ auf $35,7 \text{ mpH/min} \pm 13,5 \text{ mpH/min}$ (ca. 25 %) und in der Experimentalgruppe von $46,4 \text{ mpH/min} \pm 20,3 \text{ mpH/min}$ auf $31,3 \text{ mpH/min} \pm 15,1 \text{ mpH/min}$ (ca. 34 %). In Phase zwei (II) steigt der pH-Wert durch Gabe von D-Glucose in beiden Gruppen wieder annähernd auf den Ausgangswert und in Phase drei (III), nach Zugabe des ATP-Synthasehemmer Oligomycin, zeigte sich in beiden Gruppen einer leichte Erhöhung der mittleren ECAR, wobei die Zellen der Kontrollgruppe einen Maximalwert von 52,8

mpH/min \pm 15,3 mpH/min und die Zellen der Experimentalgruppe einen Maximalwert von 57,2 mpH/min \pm 12,9 mpH/min erreichen. Nach Hinzugabe des Glukoseanalogons 2-DG (IV) sinkt die extrazelluläre Ansäuerungsrate in der Kontrollgruppe auf 34,3 mpH/min \pm 6,5 mpH/min und in der Experimentalgruppe auf 39,0 mpH/min \pm 6,5 mpH/min.

Die durchschnittliche Standardabweichung beträgt für die Kontrollgruppe 11,4 und für Experimentalgruppe 12,4. Auch hier wurde zur Signifikanzüberprüfung der unterschiedlichen arithmetischen Mittel ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen besteht nicht.

Ausgehend von der ECAR-Bestimmung lassen sich die glykolytischen Funktionen errechnen. Diese sind in Abbildung 29 dargestellt. In der Kontrollgruppe beläuft sich die glykolytische Kapazität auf 27 mpH/min \pm 9,9 mpH/min, die glykolytische Reserve 10 mpH/min \pm 12,8 mpH/min und die basale Glykolyserate 18 mpH/min \pm 13,4 mpH/min. In der Versuchsgruppe beträgt die glykolytische Kapazität 32 mpH/min \pm 7,2 mpH/min, die glykolytische Reserve 14 mpH/min \pm 7,3 mpH/min und die basale Glykolyserate 21 mpH/min \pm 7,3 mpH/min. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden.

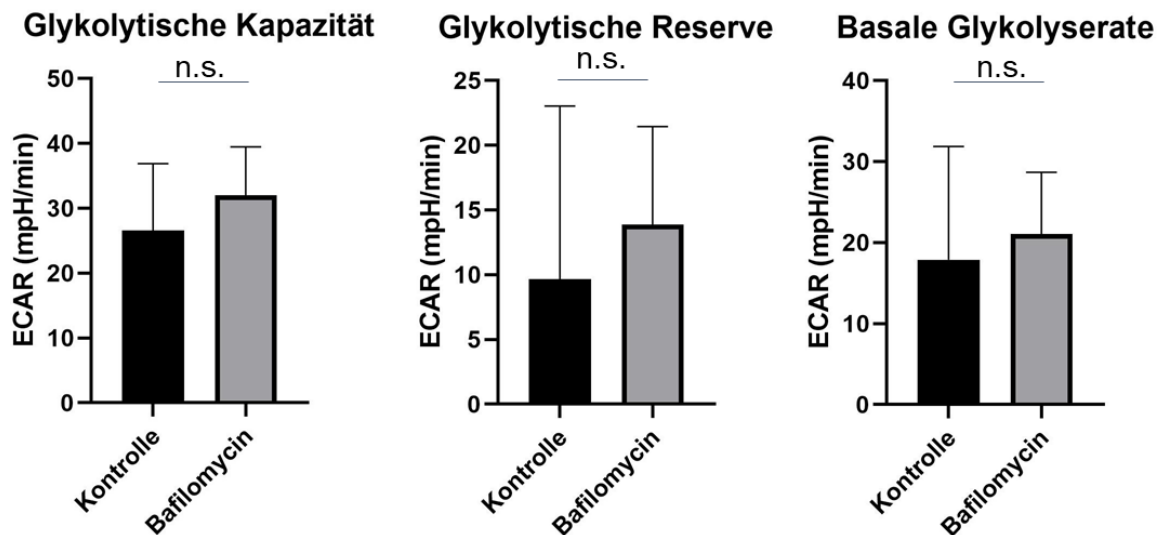


Abbildung 30 Vergleich der glykolytische Funktionen: Diese berechnen sich aus den Ergebnissen der ECAR-Messung mittels Seahorse XF Analyzer. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RPE-Gewebe unter Autophagiehemmung durch Bafilomycin A1, verglichen mit damit unbehandelten Zellen, eine signifikant niedrigere mitochondriale Aktivität bei keiner statistisch signifikanten Änderung der glykolytischen Aktivität aufweisen.

4.5 FLD-Messung

Im Anschluss wurde versucht herauszufinden, ob und inwieweit eine Autophagieinhibition durch den Einsatz von Bafilomycin A1 (1×10^{-8} M, 24h) zu einer mittels FLIO nachweisbaren Änderung der FLD des RPE führt. Abbildung 31 zeigt exemplarisch Ergebnisse einer solchen FLD-Messung.

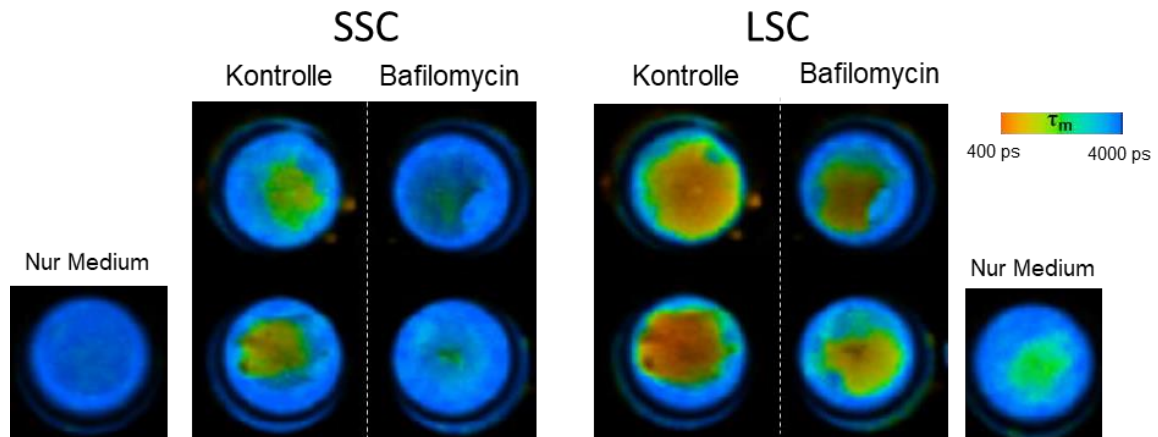


Abbildung 31 Beispielhafte farbcodierte FLD-Aufnahmen mittels FLIO; Verglichen werden können die FLD der Versuchs- und Kontrollgruppe in beiden Spektralkanälen; Quelle: eigene Aufnahme

Während der Messung waren die Explantate mit 200 μ l Medium (Sigma DMEM D5030, 4,5 g/l Glukose, 1 mM Pyruvat, 2 mM Glutamax, ohne Phenolrot) bedeckt. Da das Medium ebenfalls autofluoreszente Eigenschaften auswies, stellen sich die Ergebnisse der FLD-Messung immer als gemeinsame FLD von RPE und Medium dar. Die FLD des Mediums ohne Gewebeproben war mit 3869 ps im SSC und 2837 ps im LSC gegenüber der FLD des Mediums mit Gewebeproben verlängert. Dies lässt darauf schließen, dass die FLD des RPE ohne Medium deutlich kürzer ist. Daher sind die gemessenen FLD-Werte nicht absolut, sondern werden dazu verwendet, die Eigenschaften der Versuchs- und Kontrollgruppe zu vergleichen.

Die Ergebnisse der FLD-Messung sind in Abbildung 30 dargestellt. Im SSC (Wellenlängenspektrum 498 – 560 nm) beträgt die τ_m der RPE-Explantate der Kontrollgruppe $3318 \text{ ps} \pm 250 \text{ ps}$. Dagegen wiesen die mit Bafilomycin A1 inkubierten Zellen mit $3686 \pm 167 \text{ ps}$ eine um etwa 10 % verlängerte τ_m auf. Die Signifikanz dieser τ_m -Verlängerung wurde mittels t-Test, bei dem ein p-Wert von 0,03 ermittelt wurde, bestätigt. Die τ_m der Kontrollgruppe im LSC (Wellenlängenspektrum 560 nm – 720 nm) beträgt $2194 \pm 249 \text{ ps}$. In der Experimentalgruppe beträgt diese $2557 \text{ ps} \pm 302 \text{ ps}$. Der p-Wert beträgt 0,057. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Autophagiehemmung des RPE mittels Bafilomycin A1 zu einer signifikanten Verlängerung der τ_m (mittlere FLD) im SSC führt, es jedoch zu keiner signifikanten Änderung der τ_m im LSC kommt.

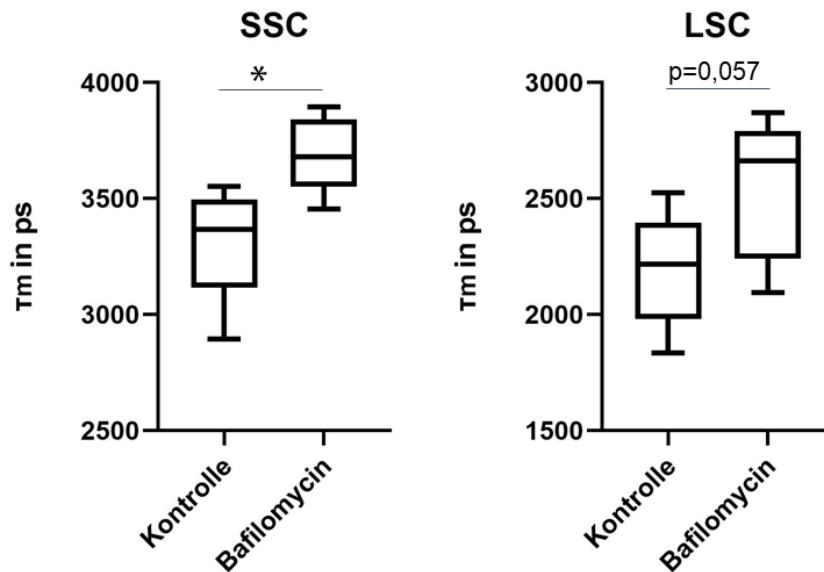


Abbildung 32 Messung der τ_m : Vergleich der mittels FLIO bestimmten τ_m zwischen mit Bafilomycin A1 behandelten ($n=6$) und unbehandelten ($n=5$) RPE-Organokulturen in den jeweiligen Spektralkanälen SSC und LSC; $*p<0,05$

Die τ_m wird aus den beiden Komponenten τ_1 und τ_2 und deren jeweiligen Amplituden (a_1 , a_2) berechnet. Neben der Auswertung der τ_m , gibt es Forschungsansätze, diese einzelnen Komponenten getrennt voneinander zu analysieren, um Hinweise auf eine Änderung des Verhältnisses der proteingebundener und der freien Form von mitochondrialen Cofaktoren wie FAD zu gewinnen⁽⁶⁰⁾. Die Amplituden a_1 und a_2 werden in Prozent angegeben und beschreiben den Einfluss der zugehörigen Komponenten auf τ_m . Veränderungen der Amplituden werden mithilfe des einheitenlosen Quotienten a_1/a_2 dargestellt.

Die Abbildungen 32 stellt diese Analyse der einzelnen Komponenten im SSC dar. Unter Autophagiehemmung zeigt sich τ_1 mit einem Mittelwert von $2722,9 \text{ ps} \pm 230,6 \text{ ps}$ gegenüber der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $2374,1 \text{ ps} \pm 124,9 \text{ ps}$ signifikant erhöht ($p=0,02$). Die von Ausreißer bereinigte Komponente τ_2 verkürzt sich unter Bafilomycin A1 einfluss im Mittel nicht signifikant von $6103,7 \text{ ps} \pm 261,6 \text{ ps}$ gegenüber der Kontrollgruppe mit $6180 \text{ ps} \pm 72,7 \text{ ps}$. Das Amplitudenverhältnis beider Komponenten a_1/a_2 beträgt unter Autophagieinhibition $2,3 \pm 0,2$ und ist gegenüber dem Amplitudenverhältnis der Kontrollgruppe von $2,46 \pm 0,2$ vermindert. Dieser Unterschied ist jedoch nicht statistisch signifikant.

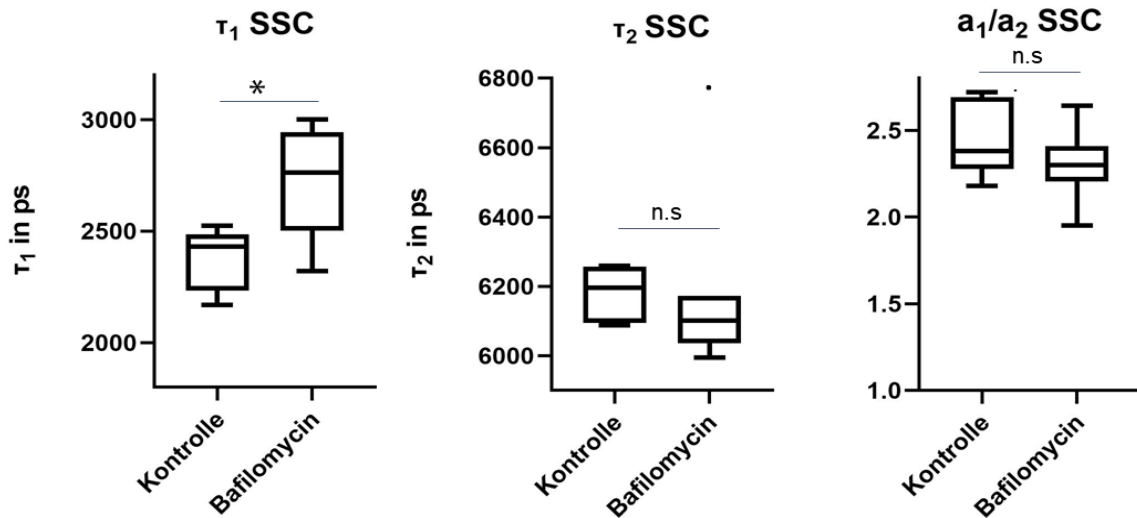


Abbildung 33 Komponentenanalyse des kurzen FLIO-Spektralkanal: mithilfe des Ausreißertest nach Grubbs wurde für τ_2 im SSC bei einem Signifikanzniveau von 0,01 ein Ausreißer in der Versuchsgruppe identifiziert und als solcher in der Grafik mit einem Punkt gekennzeichnet ($\tau_2 = 6786,45$ ps); n (Kontrolle) = 5, n (Bafilomycin A1) =6, * $p < 0,05$

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse der Komponentenanalyse des LSC. Wie im SSC ist die Komponente τ_1 im LSC unter Autophagieinhibition mit einem Mittelwert von $2374 \text{ ps} \pm 285,7 \text{ ps}$ gegenüber dem Mittelwert der Kontrollgruppe von $2023 \text{ ps} \pm 195,8 \text{ ps}$ signifikant verlängert ($p = 0,04$). Der Mittelwert der Versuchsgruppe der Komponente τ_2 beträgt im LSC $2969,5 \text{ ps} \pm 587,1 \text{ ps}$. Dem gegenüber beträgt der Mittelwert der Kontrollgruppe $2473,2 \text{ ps} \pm 265 \text{ ps}$. Die Abweichung beider Gruppen ist nicht signifikant. Das Amplitudenverhältnis a_1/a_2 im LSC beträgt in der Versuchsgruppe im Mittel $1,3 \pm 0,08$ und in der Kontrollgruppe $1,1 \pm 0,04$. Mit einem p-Wert von 0,002 gilt die Bafilomycin A1 bedingte Erhöhung des Quotienten als hochsignifikant.

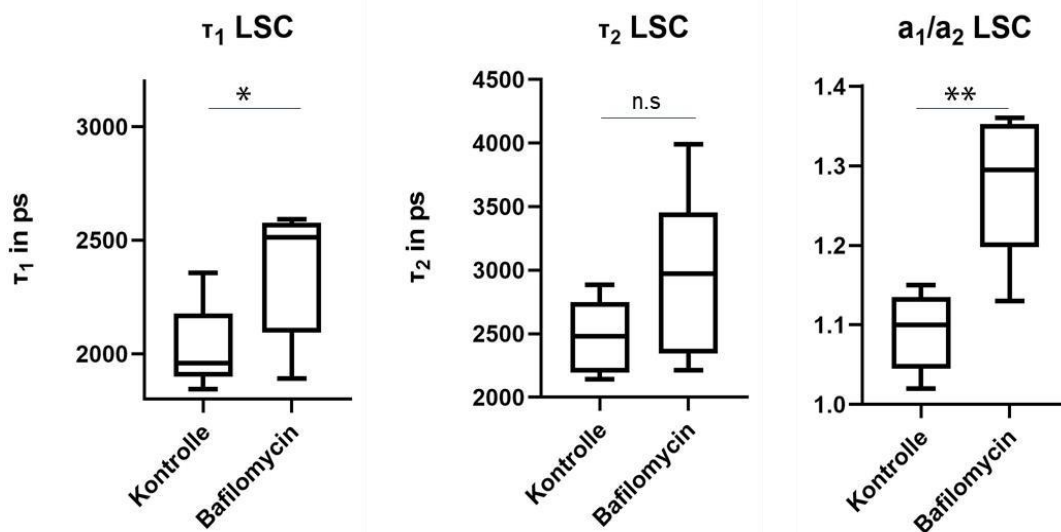


Abbildung 34 Komponentenanalyse des langen FLIO-Spektralkanal: n (Kontrolle) = 5, n (Bafilomycin A1) =6; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

5 Diskussion der Studienergebnisse

Die Experimente wurden an RPE/Choroidea-Explantaten durchgeführt, welche mittels einer bereits etablierten Methode aus Schweineaugen gewonnen wurden. Ausgehend von den Ergebnissen des Calcein-Tests und stabilen Ergebnissen der nachfolgenden Funktionsanalysen, lässt sich bestätigen, dass diese Methode zur Kultivierung von RPE-Zellen geeignet ist. Die signifikant autophagiehemmende Wirkung von Bafilomycin A1 wurde ebenfalls anhand einer bereits etablierten Methode bestätigt.

5.1 Energiemetabolismus der RPE-Zellen unter Autophagieinhibition

Um Physiologie und Pathophysiologie der Netzhaut besser zu verstehen, wurden in den vergangenen Jahren von unterschiedlichen Arbeitsgruppen OCR- und ECAR- Messungen an verschiedenen kultivierten RPE-Gewebe durchgeführt. Eine Seahorse-XF-Messung von ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten unter Autophagieinhibition mittels Bafilomycin A1 ist dabei bisher nicht erfolgt und konnte erstmalig erfolgreich durchgeführt werden.

5.1.1 Mitochondriale Aktivität der RPE -Zellen unter Autophagieinhibition

Es konnte gezeigt werden, dass eine Autophagiehemmung der RPE-Zellen mittels Bafilomycin A1 eine Reduktion der mitochondrialen Zellatmung mitsamt der mitochondrialen Funktionen nach sich zieht. Im Jahr 2017 untersuchte Redman et al. den Effekt von Bafilomycin A1 auf den Energiestoffwechsel von kortikalen Rattenneuronen⁽⁶⁵⁾. Anhand mittels PCR ermittelten, signifikant gehäuften Schäden der mitochondrialen DNA der mit Bafilomycin A1 behandelten Zellen, wurde ein negativer Effekt von Bafilomycin A1 auf die Qualität der Mitochondrien der Neurone deduziert. Weiterhin zeigte sich die OCR und alle mitochondrialen Funktionen der autophagieinhibierten neuronalen Zellen gegenüber der Vergleichsgruppe reduziert. Als Erklärungsansatz für diesen Effekt wird die durch die Autophagiehemmung hervorgerufene Unfähigkeit der Zellen, durch oxidativen Stress beschädigte Zellen zu ersetzen, herangeführt⁽⁶⁵⁾. Dies entspricht den Beobachtungen dieser Arbeit anhand ex-vivo RPE-Organokulturen. Auch die Ergebnisse von OCR-Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, welche die mitochondriale Aktivität von primären RPE-Zellkulturen von menschlichen Embryonen und adulten Augenspendern im Alter von 68-72 oder primären RPE-Zellkulturen von Patienten mit und ohne AMD-Vorerkrankung miteinander verglichen, registrierten eine Reduktion der mitochondrialen Aktivität, welche sich in einer Reduktion der OCR ausdrückte^(24, 67).

Eine Auffälligkeit in den OCR-Daten, welche in dieser Arbeit erhoben wurden, ist das Fehlen eines signifikanten OCR-Anstiegs über das Niveau der basale Zellatmung hinaus nach Zugabe des Entkopplers FCCP zu Beginn der dritten Phase des Experiments. Dies wird vor allem in der Vergleichsgruppe deutlich, deren maximale Zellatmung sogar hinter der basalen Zellatmung zurückbleibt. Daraus lässt sich schließen, dass das RPE in der ex-vivo-Organkultur bereits in Ruhe ihr maximales mitochondriales Potenzial ausschöpft und über kaum respiratorische Reserven verfügt.

Da OCR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyzer an dieser Art von RPE-Organkultur zum ersten Mal durchgeführt wurde, ist es nicht klar, ob diese Beobachtung den unphysiologischen Bedingungen während der Kultivierung und Messungen geschuldet ist, oder ob eine niedrige respiratorische Reserve eine Eigenschaft von RPE ist. Allerdings ließ sich in vorangegangenen OCR-Untersuchungen durch Rohrer et. al. (2016) eine positive respiratorische Reserve für primäre, embryonale RPE-Zellkulturen feststellen, während die maximale Zellatmung primärer RPE-Zellkulturen von gealterten Augenspendern hinter der basalen Zellatmung zurückblieb⁽⁶⁷⁾. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse könnten die verwendeten Bedingungen für die Organkulturen nicht optimal gewesen sein. Diese Beurteilung könnte nützlich sein um bei zukünftigen Untersuchungen an ex-vivo RPE-Organkulturen Zellstress zu reduzieren. Obwohl der OCR-Verlauf der Vergleichsgruppe von den Beobachtungen vorangegangener Studien abwich, zeigte sich dieser stabil und reproduzierbar.

5.1.2 Glykolytische Aktivität der RPE -Zellen unter Autophagieinhibition

Die Auswertung der ECAR-Messergebnisse gestaltete sich als schwierig. Im Laufe der Bearbeitungszeit wurde versucht, die Konzentrationen der verwendeten Wirkstoffe zu optimieren. Nach Voruntersuchungen unter der Verwendung von 10 mM D-Glukose, wurde die ECAR von je 16 Einzelmessungen unter der Verwendung von 25 mM und 50 mM D-Glukose und 1×10^{-8} M Bafilomycin A1 sowie die ECAR von 25 mM und 2×10^{-8} M Bafilomycin A1 ermittelt.

Alle ermittelten ECAR-Ergebnisse zeigten eine instabile basale Glykolyserate. So nahm die ECAR im Verlauf von Phase eins ohne den Einfluss eines Wirkstoffs in allen Messergebnissen ab. Ein erwarteter Anstieg der ECAR nach Zugabe von D-Glucose und Oligomycin sowie ein Abfallen der ECAR nach Zugabe von 2-DG konnten in allen Messungen in der Tendenz beobachtet werden. Zwischen der Kontroll- und mit Bafilomycin A1 behandelten Versuchsgruppe konnte in allen untersuchten ECAR-Parametern kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

In Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals ECAR-Messungen an porzinen ex-vivo RPE/Choroidea-Explantaten unter Autophagieinhibition durchgeführt. In vorangegangenen Studien, in denen die ECAR von primären RPE-Zellkulturen von menschlichen Embryonen und gealterten adulten Augenspendern verglichen wurden, wurde eine signifikante Reduktion der glykolytischen Aktivität in den primären Zellkulturen der gealterten Augenspender festgestellt⁽⁶⁷⁾. Gleiches gilt für Studien, welche primären RPE-Zellkulturen von Patienten mit und ohne AMD-Vorerkrankung untersuchten⁽²⁴⁾. Ähnliche Ergebnisse konnten in dieser Arbeit unter Verwendung des Autophagieinhibitors Bafilomycin A1 nicht reproduziert werden. Obwohl sich die Mittelwerte der ECAR beider untersuchten Gruppen nicht signifikant unterschieden, zeigten sich die glykolytischen Funktionen basale Glykolyserate, glykolytische Kapazität und glykolytische Reserve, der mit Bafilomycin A1 autophagieinhibierten Versuchsgruppe gegenüber der mit DMSO behandelten Vergleichsgruppe, um je 15 %, 17 %, und 30 %, erhöht. Diese Beobachtungen könnten eine Folge der oben beschriebenen, im Verlauf des Experiments abnehmenden, basalen Glykolyserate sein. Weiterhin könnten die Unterschiede der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen ECAR und den Ergebnissen der ECAR-Messungen anhand von primären Zellkulturen von Rohrer et. al. und Ferrington et. al. auch an den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der ex-vivo RPE-Organokulturen zu finden sein. Diese Fragen verlangen weitere Untersuchungen in ex-vivo-Organokulturbedingungen in der Zukunft.

In dieser Studie wurden die Auswirkungen einer Autophagieinhibierung mittels einer Behandlung von Bafilomycin A1 auf den Energiestoffwechsel von RPE/Choroidea-Explantaten erstmals mittels Seahorse XF Analyzer untersucht. Unter Autophagiehemmung zeigte sich, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, eine signifikant reduzierte mitochondriale Aktivität. Für die Aktivität der anaeroben Glykolyse konnte keine signifikante Aktivitätsänderung festgestellt werden. Diese Studie bestätigt den Wert der verwendeten Methode zur Gewinnung von ex-vivo RPE-Organokulturen zur Beurteilung des Energiestoffwechsels von RPE-Gewebe. Dies könnte in zukünftigen Arbeiten von Nutzen sein, um die Bedeutung von Energiestoffwechseleränderungen und Beeinträchtigung der Autophagieleistung des RPE für die Pathogenese von AMD zu untersuchen.

5.2 FLD der RPE-Zellen unter Autophagieinhibition

Im Anschluss wurde überprüft, inwieweit sich die, durch OCR- und ECAR-Messungen ermittelten Effekte einer Autophagiehemmung auf den Energiestoffwechsel des RPE, auf deren FLD auswirken. Es wurde gezeigt, dass FLIO dazu in der Lage ist, metabolische Veränderungen dieser Art zu detektieren. Die mittlere FLD τ_m war im Gegensatz zu den metabolisch nicht beeinflussten Organkulturen im SSC (Wellenlängenspektrum 498 nm – 560 nm) signifikant verlängert. Im LSC (Wellenlängenspektrum 560 nm – 720 nm) verfehlte die FLD-Verlängerung die Grenze zur Signifikanz. Diese Verlängerung wurde maßgeblich durch die in beiden Spektralkanälen signifikante Verlängerung der Komponente τ_1 herbeigeführt. Das Amplitudenverhältnisses a_1/a_2 zeigte sich im SSC nicht signifikant verändert und im LSC hochsignifikant verlängert. Im SSC wurden durchweg längere τ_m -Werte festgestellt als im LSC. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von anderen in-vivo Messungen und ex-vivo Messungen der FLD^(16, 31).

FLIO hat als diagnostische Methode großes Potential. Dennoch sind Rückschlüsse von einer Änderung der FLD auf ihre molekulare Ursache komplex und noch nicht ausreichend untersucht. Die FLD von Zellkulturen, Organkulturen und in-vivo-Messungen unterscheiden sich stark, da die mittlere FLD aus den Lichtemissionen aller oberflächlichen Zellschichten der Retina errechnet wird. In dem in dieser Arbeit verwendeten Organkulturmodell wurde die Neuroretina entfernt, sodass lediglich die RPE-Zellen, Bruch-Membran und Choroidea zur ermittelten FLD beitragen. Zusätzlich setzt sich die FLD von RPE aus den FLD aller in diesem Gewebe befindlichen, angeregten Fluorophore zusammen. Da Schweineaugen im Gegensatz zu Menschaugen keine Makula aufweisen, enthalten die verwendeten ex-vivo RPE-Organkulturen kein Makulapigment. Aufgrund des jungen Schlachtalters der Schweine, von denen das verwendete RPE-Gewebe entnommen wurde, ist das mit dem Alterungsprozess assoziierte Lipofuszin ebenfalls zu vernachlässigen.

Eine Hypothese, die die gemessenen FLD-Veränderungen in Folge der durch Bafilomycin A1 induzierten Änderungen des Energiestoffwechsels erklären könnte, betrifft die Redoxcoenzyme NADH und FAD. Der in FLIO integrierte Laser regt den Augenhintergrund mit einer Wellenlänge von 473 nm an und die beiden Spektralkanäle erfassen Emissionen im Wellenlängenbereich von 498 nm bis 720 nm. Mit Absorptions- und Emissionsspektren von $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 300\text{ nm}-380\text{ nm}/450\text{ nm}-500\text{ nm}$ kann NADH daher mittels FLIO nicht erfasst werden. Die Absorptions- und Emissionsmaxima von FAD beträgt dagegen $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 370\text{ nm}$ und $450\text{ nm}/535\text{ nm}$ ⁽⁵⁵⁾. Hierdurch ist FAD mittels FLIO erfassbar. Das Emissionsspektrum von FAD wird in Abbildung 34 dargestellt.

Wie bereits beschrieben, verändert FAD seine FLD abhängig von seinem Proteinbindungsstatus. Im ungebundenen Zustand ist die FLD mit 2300 ps deutlich gegenüber der FLD von 130 ps im proteingebundenen Zustand verlängert⁽⁶⁰⁾. Dieser Zusammenhang könnte die Verlängerung der τ_m -Werte in beiden Spektralkanälen erklären: Durch die OCR- und ECAR Messungen konnte belegt werden, dass Bafilomycin A1 zu einer signifikanten Reduzierung des Sauerstoffverbrauchs der Zellen führt, was auf eine reduzierte mitochondriale Aktivität schließen lässt. Eine Verringerung der mitochondrialen Aktivität könnte wiederum mit einem vermehrten Anteil von FAD im nicht proteingebundenen Zustand assoziiert werden, was somit eine Verlängerung der τ_m nach sich ziehen würde. Diese τ_m -Verlängerung lässt sich interessanterweise nicht nur am vorliegenden AMD-Modell, sondern auch bei in-vivo FLD-Untersuchungen an AMD - Patienten nachweisen⁽¹⁷⁾.

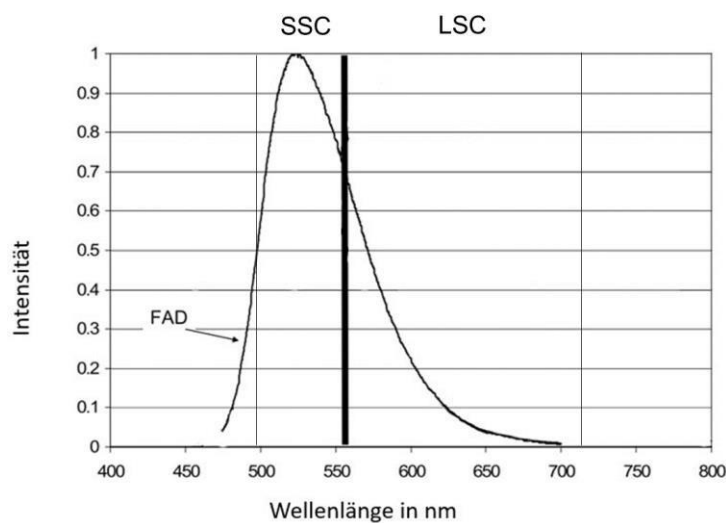


Abbildung 35 Emissionsspektrum von FAD bei einer Anregungswellenlänge von 473 nm; dargestellt sind zudem die von den beiden Spektralkanälen SSC und LSC abgedeckten Wellenlängenbereiche. Das Maximum der Emission von FAD entfällt auf den SSC; modifiziert nach Schweitzer⁽⁷¹⁾

Für die Identifizierung des Proteinbindungszustandes von FAD als Ursache für die Verlängerung der FLD des RPE unter Autophagieinhibition, spricht ebenfalls die signifikantere τ_m -Verlängerung im SSC, da FAD in diesem Wellenlängenbereich sein Emissionsmaximum aufweist. Das Amplitudenverhältnis a_1/a_2 zeigt sich in der Versuchsgruppe im SSC nicht signifikant verändert. Im LSC induzierte die Autophagiehemmung durch Bafilomycin A1 eine hochsignifikante Zunahme im Amplitudenverhältnis a_1/a_2 . Dies könnte mit der Abnahme des Verhältnisses von proteingebundenem zu freien FAD erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Untersuchung von ex-vivo RPE-Organokulturen mittels FLIO dazu in der Lage ist, Veränderungen im Energiestoffwechsel gegen-

über einer Kontrollgruppe anhand einer verlängerten τ_m zu detektieren. Diese Beobachtungen stimmen mit Ergebnissen von in-vivo-FLD-Messungen von Patienten mit AMD überein und unterstützen damit wiederum die Theorie, dass die Pathogenese dieser Augenkrankheit mit Veränderungen im Energiestoffwechsel und einer verminderte Autophagiefähigkeit der RPE-Zellen zusammenhängen könnte.

Eine mögliche Ursache für die Verlängerung der FLD der RPE unter Autophagieinhibition könnte das abgenommene Verhältnis von proteingebundenen und freien FAD darstellen. Eine direkte Messung dieses Anteils in weiteren Untersuchungen könnte wertvolle Hinweise über die Korrektheit dieser Mutmaßung liefern. Die genaue Zuordnung der einzelnen Fluorophore ist derzeit nicht eindeutig möglich. Hierfür sind weitere Studien notwendig, um den Einsatz von FLIO als diagnostisches Instrument in der Augenheilkunde zu etablieren.

5.3 Limitierungen der Arbeit

5.3.1 Das verwendete Organkulturmodell

Obwohl die Lichtsinnesorgane aller Wirbeltiere eine Differenzierung von pigmentierten Zellen und lichtsensitiven Zellen aufweisen, unterscheiden sich deren histologische und physiologische Eigenschaften zwischen den individuellen Spezies⁽⁴⁷⁾. Von den Nichtprimaten weist das Auge des Hausschweins (*Sus Scrofa*) die meisten Gemeinsamkeiten mit dem menschlichen Auge hinsichtlich Größe und Aufbau, wie etwa die Existenz einer zehngeschichteten Retina, gefolgt von Bruch-Membran und Choroidea auf⁽⁴⁴⁾. Eine weitere Gemeinsamkeit von Menschen- und Schweineaugen ist das Fehlen einer reflektierenden Schicht hinter der Netzhaut, das Tapetum genannt wird^(45, 68). Die Ähnlichkeit der retinalen Struktur beider Spezies lässt sich mittels OCT-Scans bestätigen⁽³¹⁾. Ein wesentlicher struktureller Unterschied ist dagegen das Fehlen von Makula und Fovea in Schweineaugen⁽⁴⁴⁾. Das Arbeiten an Schweineaugen ist aufgrund ihrer Größe im Vergleich zu Augen anderer Spezies, wie z.B. Mäusen, einfach. Darüber hinaus bieten Schweineaugen den Vorteil, als Abfallprodukt der fleischverarbeitenden Industrie in großen Mengen und ethisch unbedenklich verfügbar zu sein⁽⁴⁴⁾.

Trotz aller Vorteile lassen sich Erkenntnisse, welche bei der Untersuchung von tierischem Gewebe gewonnen wurden, nicht immer direkt auf den Menschen übertragen und müssen daher als Modell betrachtet werden. Das einschichtige RPE-Gewebe ist aufgrund seiner Mittlerfunktion zwischen der Choroidea und den Fotorezeptorzellen in seiner Funktion von den benachbarten Gewebearten abhängig⁽⁴⁴⁾. Die in den Versuchen verwendeten ex-vivo-RPE/Choroidea-Explantate wurden die Zellen jedoch von der Neuroretina getrennt, was Auswirkungen auf den Energiemetabolismus der Zellen in der Organkultur vermuten lässt.

Weiterhin erschwert dieser Arbeitsschritt die Vergleichbarkeit mit dem Einsatz von FLIO in vivo am Patienten. Obwohl eindeutige Erkenntnisse fehlen, inwieweit sich eine Cokultivierung von RPE-Zellen mit oder ohne Neuroretina vorteilhaft für das Überleben der RPE-Zellen ist, wird vermutet, dass sich der deutlich früher einsetzende Zelltod der Fotorezeptoren negativ auf das Überleben der RPE-Zellen auswirken könnte⁽⁵⁴⁾. Durch die geringeren Mengen von Fluorophoren wie Lipofuszin und AGE sowie das Fehlen von Makulapigment lässt eine RPE-Organkultur vom Schwein jedoch als ein geeignetes Modell für die Erforschung von weniger prominenten Fluorophoren der Netzhaut erscheinen⁽³¹⁾. Die für diese Arbeit verarbeiteten Schweineaugen wurden in einer nahen Großschlachtereie gekauft. Inwieweit sich diese Stichprobe in Alter und Geschlecht unterscheiden oder an eventuell vorhandenen systemischen oder genetischen Erkrankungen litten, war nicht nachzuvollziehen. Degenerative Vorerkrankungen der Tiere waren jedoch aufgrund des jungen Schlachalters unwahrscheinlich.

Ex-vivo-Gewebeproben erlauben die Erforschung von dem Organismus entnommenen Gewebe unter kontrollierten Bedingungen. Dennoch stellte die durchgeführte Art und Weise der Präparation von RPE einen radikalen Eingriff für die Zellen dar, der mit enormem Stress verbunden war. Je nach Geschwindigkeit der Präparation und Geschick des Präparators ist dieser Stress in den jeweiligen Zellproben unterschiedlich stark ausgeprägt. Um die Wahrscheinlichkeit für das Absterben von RPE-Zellen in der Dauer zwischen dem Tod des Tieres und der Kultivierung des Gewebes in Kulturmedium so gering wie möglich zu halten, wurden die Augen während des gesamten Vorgangs gekühlt, lichtgeschützt transportiert und so schnell wie möglich verarbeitet. Als maximale Verarbeitungsdauer wurden vier Stunden nicht überschritten. Trotz dieser sorgfältigen Behandlung konnten individuelle Unterschiede zwischen den Explantaten nicht vollständig vermieden werden. Daher wurden in dieser Studie eine relativ große Anzahl an Organkulturen untersucht, damit eine aussagekräftige statistische Analyse durchgeführt werden konnte.

Die Bedingungen der RPE-Choroid-Explantate während der Kultivierung waren statisch. Trotz der Inkubation bei Körpertemperatur und der Bereitstellung von Nährstoffen durch das Kulturmedium entsprechen diese Bedingungen nicht denen des Gewebes in-vivo. Beispielsweise nimmt der Nährstoffgehalt im Verlauf der Inkubation stetig ab, während die Stoffwechselprodukte akkumulieren. Das Ergebnis des Calcein-Tests beweist, dass die Organkulturen keinen großflächigen morphologischen Schaden nahmen. Dennoch hätte die Inkubation durch Verwendung eines Perfusionsmodells, bei dem das Kulturmedium ständig ausgetauscht wird, den physiologischen Bedingungen angenähert werden können. Alle Funktionsmessungen der Explantate wurden nach eintägiger Inkubation durchgeführt. Hierdurch war zum einen die Zeit gegeben, die Messungen in Ruhe vorzubereiten und zum

anderen wurden durch die relativ kurze Inkubationszeit Schäden am Gewebe durch die beschriebenen unphysiologischen Bedingungen vermieden. Ein Vorteil der verwendeten Kultivierungsmethode im Vergleich zur Kultivierung der RPE-Zellen mitsamt Sklera ist, dass die Nährstoffe die Zellen von beiden Seiten umspülen konnten.

5.3.2 Kritik an der Methodik der OCR- ECAR- und FLD-Messungen

Alle vorgestellten Messergebnisse wurden von einem Untersucher erhoben, wodurch interindividuelle, untersucherabhängige Messfehler umgangen wurden. Daten wurden an beiden Geräten erst nach einer Einarbeitungsphase mit vorbereitenden Versuchen begonnen. Die Messeinstellungen wurden protokolliert. Der Seahorse-XF-Analyzer und FLIO führen die OCR-, ECAR- und FLD-Messungen automatisiert durch, was zufällige Messfehler minimiert, aber nicht ausschließen kann. Weitere denkbare, zufällige Fehlerquellen umfassen Ungenauigkeiten bei der Vorbereitung und Durchführung der Messungen seitens des Untersuchers. Für die Auswertung der FLD wurde mittels eines Auswahltools der Software Fiji ein flächendefinierter Bereich im Zentrum jeder vermessenen Probe analysiert. Es gab keine Möglichkeit, die Auswahl vollständig zu standardisieren und wurde daher manuell durchgeführt. Hierdurch treten bei wiederholter Auswertung derselben Messergebnisse geringfügige Schwankungen der FLD auf.

6 Abkürzungsverzeichnis

A2E	N-retinyliden-Nretinylethanolamin
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
Anti-VEGF	Anti-vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Calcein- AM	Calcein-Acetoxymethylester
CO₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
eng.	Aus dem Englischen
et al.	Und andere (lat. et alii)
FAF	Fundusautofluoreszenz
FAD	Oxidiertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FADH	Reduziertes Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCCP	4-Trifluormethoxyphenylhydrazonomalononitril
FLD	Fluoreszenzlebensdauer
FLIO	Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie
FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie
h	Stunde
H⁺	Wasserstoff
H₂O	Wasser
Hsg.	Herausgeber
LSC	langwelliger Spektralkanal (eng. long spectral channel)
λ_{ex}	Absorptionsspektrum bzw. Absorptionsmaximum
λ_{em}	Emissionsspektrum bzw. Emissionsmaximum
min	Minute
NAD⁺/H	Nicotinamidadenindinukleotid
n.s.	Nicht signifikant
n	Anzahl, Stichprobenumfang
Nr.	Nummer

OCR	Sauerstoffverbrauchsrate (eng. oxygen consumption rate)
OCT	Optische Kohärenztomografie
O₂	Sauerstoff
p	Signifikanzwert
ps	Pikosekunde
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (eng. phosphate-buffered saline)
POS	Fotorezeptoraußensegmente (eng. photoreceptor outer segments)
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (eng. Reactive oxygen species)
Pr.-Nr.	Produktnummer
RPE	Retinales Pigmentepithel
S.	Seite
SSC	Kurzwelliger Spektralkanal (eng. Short spectral channel)
s.u.	Siehe unten
TCSP	Zeitabhängige Einzelphotonenmessung (eng. time correlated single photon counting)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
z.B.	Zum Beispiel
2-DG	2-Desoxy-D-Glukose

7 Literaturverzeichnis

- 1 Acharya N. K., Qi X., Goldwasser E. L., Godsey G. A., Wu H., Kosciuk M. C., Freeman T. A., Macphee C. H., Wilensky R. L., Venkataraman V., Nagele R. G.: Retinal pathology is associated with increased blood-retina barrier permeability in a diabetic and hypercholesterolaemic pig model: Beneficial effects of the LpPLA2 inhibitor Darapladib. *Diabetes & Vascular Disease Research* 14, S. 200-213 (2017)
- 2 Agilent-technologies: Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, User Guide Kit 103015-100, Agilent Technologies, Wilmington (2019)
- 3 Agilent-technologies: Agilent seahorse XF sensor cartridges and cell culture microplates - The world's most advanced plastic ware essential for Agilent Seahorse XF Analyzers, Wilmington (2017)
- 4 Agilent-technologies: Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit User Guide Kit 103020-100, Agilent Technologies, Wilmington, (2019)
- 5 Al-Zamil W. M. und Yassin S. A.: Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clinical Interventions in Aging*, 12, S. 1313-1330 (2017)
- 6 Becker W., Bergmann A., Biskup C.: Multispectral fluorescence lifetime imaging by TCSPC. *Microscopy Research and Technique*, 70, S. 403-409 (2007)
- 7 Bertram B., Holz F., Kellner U., Reinhard T.: Leitlinie Nr. 21 Altersabhängige Makuladegeneration AMD (2015)
- 8 Brandt, U.: Der Citratcyclus - Abbau von Acetyl-Coa zu CO₂ und H₂O. In: Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie* Hsg. Heinrich P., Müller H., Graeve L., S. 226-234, Springer-Medizin Verlag, Berlin (2014)
- 9 Brown C. N., Green B. D., Thompson R. B., den Hollander A. I., Lengyel I.: Metabolomics and Age-Related Macular Degeneration. *Metabolites*, 9, S. 4 (2018)
- 10 Burk A. und Burk R. O.: Checkliste Augenheilkunde, S. 258, Thieme Verlag, Stuttgart (2005)
- 11 Cox G.: *Optical Imaging Techniques*, S. 29-37, S. 195-209, Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton, USA (2007)
- 12 Dithmar S. und Celik N.: RPE Autofluorescence. In: *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Hsg. Klettner A. K., Dithmar, S., S. 233-245, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2020)

- 13 Divakaruni A. S., Paradyse A., Ferrick D. A., Murphy A. N., Jastroch M.: Analysis and interpretation of microplate-based oxygen consumption and pH data. *Methods Enzymol*, 547, S. 309-354 (2014)
- 14 Dröse S. und Altendorf K.: Bafilomycins and Concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases. *The Journal of Experimental Biology*, 1–8 (1997)
- 15 Dysli C. Dysli M.: FLIO in the Healthy Eye. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 49-53, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 16 Dysli C. Dysli M., Enzmann V., Wolf S., Zinkernagel M. S.: Fluorescence lifetime imaging of the ocular fundus in mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55, S. 7206-7215 (2014)
- 17 Dysli C., Quellec G., Abegg M., Menke M. N., Wolf-Schnurrbusch U., Kowal J., Blatz J., Schiazza O., Leichtle A. B., Wolf S, Zinkernagel M. S.: Quantitative analysis of fluorescence lifetime measurements of the macula using the fluorescence lifetime imaging ophthalmoscope in healthy subjects. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 55, S. 2106-2113 (2014)
- 18 Dysli C. und Sauer L.: Age-Related Macular Degeneration. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 57-64, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 19 Dysli C., Sauer L., Klemm M.: Image Acquisition and Analysis. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 23-34, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 20 Dysli C., Wolf S., Berezin M. J., Sauer L., Hammer M., Zinkernagel M. S.: Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Progress in retinal eye research*, 60, S. 120-143 (2017)
- 21 Dysli C., Zinkernagel M., Wolf S.: The Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscope. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 17-21, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 22 Edinburgh-Instruments: What is TCSPC? Time-Correlated Single-Photon Counting - technical note, Livingston (2013)
- 23 Entezari M., Karimi S., Ramezani A., Fekri Y., Kheiri B.: Choroidal Thickness in Healthy Subjects. *Journal of Ophthalmic and Vision Research*, 13, S. 39-43 (2018)

- 24 Ferrington D. A., Ebelinga M. C., Kappahna R. J., Terluca M. R., Fishera C. R., Polanco J. R., Roehrich H., Learya M. M., Gengd Z., Duttond J. R., Montezumaa S. R.: Altered bioenergetics and enhanced resistance to oxidative stress in human retinal pigment epithelial cells from donors with age-related macular degeneration. *Redox Biology*, 13, S. 255-265 (2017)
- 25 Ferrington D. A., Fisher C. R., Kowluru R. A.: Mitochondrial defects drive degenerative retinal diseases. *Trends in molecular medicine*, 26, S. 105-118 (2020)
- 26 Fisher C. R. und Ferrington D.: Perspective on AMD Pathobiology: A Bioenergetic Crisis in the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59, S. 41-47 (2018)
- 27 García-Layana A., Cabrera-López F., García-Arumí J., Arias-Barquet L., Ruiz-Moreno J. M.: Early and intermediate age-related macular degeneration: update and clinical review. *Clinical Interventions in Aging*, 12, S. 1579-1587 (2017)
- 28 Golestaneh N., Chu Y., Xiao Y., Stoleru G. L., Theos A. C.: Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death & Differentiation*, 8 (2017)
- 29 Grehn F.: *Augenheilkunde*, 31, S. 255-260, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, 2012
- 30 Hammer M.: FLIO Historical Background. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., S. 7-11, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 31 Hammer M., Sauer L., Klemm M., Peters S., Schultz R., Haueisen J.: Fundus autofluorescence beyond lipofuscin: lesson learned from ex vivo fluorescence lifetime imaging in porcine eyes. *Biomedical Optics Express*, 9, S. 3078-3091 (2018)
- 32 Hanus J., Anderson C., Wang S.: RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Research Reviews*, 24, S. 286-298 (2015)
- 33 Horn F.: *Biochemie des Menschen - Das Lehrbuch für das Medizinstudium*, 5. Auflage, S. 79-96, 200-234, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2012)
- 34 <https://www.lambertinstruments.com/technologies-1/2014/12/4/fluorescence-lifetime-imaging-microscopy>, Tag des Zugriffs: 12.09.2020 15:45
- 35 <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/glycolysis-assays-using-cell-analysis-technology>, Tag des Zugriffs: 08.07.2020 19:20

- 36 <https://www.agilent.com/search/?N=4294836537>, Tag des Zugriffs: 11.07.2020 17:30
- 37 Hutfilz A., Sonntag S. R., Lewke B., Theisen-Kunde D., Grisanti S., Brinkmann R., Miura Y.: Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy of the Retinal Pigment Epithelium During Wound Healing After Laser Irradiation. *Translational Vision Science and Technology*, 8, (2019)
- 38 Jastroch M., Divakaruni A. S., Mookerjee S., Treberg J. R., Brand M. D.: Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays in Biochemistry*, 47, S. 53-67 (2010)
- 39 Kaarniranta K., Salminen A., Kauppinen A.: Retinal Pigment Epithelium in Age-Related Macular Degeneration. In: *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Hsg. Klettner A. K., Dithmar S., S.161-171, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2020)
- 40 Kaarniranta K., Sinha D., Blasiak J., Kauppinen A., Veréb Z., Salminen A., Boulton M., Petrovski G.: Autophagy and heterophagy dysregulation leads to retinal pigment epithelium dysfunction and development of age-related macular degeneration. *Autophagy*, 9, S. 973-984 (2013)
- 41 Kanow M. A., Giarmarco M. M., Tsantilas K., Engel A. L., Farnsworth C. C., Lindsay K. L., Parker E. D., Chao J. R., Jankowski C., Du J., Hurley J. B.: Biochemical adaptations of the retina and retinal pigment epithelium support a metabolic ecosystem in the vertebrate eye. *eLife*, 6 (2017)
- 42 Kaußler C.: Fluoreszenzlebensdauermessungen von retinalem Pigmentepithelium (RPE) unter Verminderung der Autophagieaktivitäten, Bachelor of science Lübeck (2018)
- 43 Kern K.: Reaktionen von Zellen des retinalen Pigmentepithels auf transiente Hyperthermie, S. 8, Doktor rer. Nat. Lübeck (2018)
- 44 Klettner A. K. und Dithmar S.: Retinal Pigment Epithelium Cell Culture. In: *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Hsg. Klettner A. K. und Dithmar S., S. 295-305, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2020)
- 45 Klettner A. und Miura Y.: Porcine RPE/Choroidal Explant Cultures. In: *Retinal Degeneration: Methods and Protocols*. Hsg. Weber B. H., Langmann T., S. 109-118, Springer Verlag, New York, (2019)
- 46 Kurihara T., Westenskow P. D., Gantner M. L., Usui Y., Schultz A., Bravo S., Aguilar E., Wittgrove C., Friedlander M, Paris L. P., Chen E., Siuzdak G., Friedlander M.:

- Hypoxia-induced metabolic stress in retinal pigment epithelial cells is sufficient to induce photoreceptor degeneration. *eLife*, 5, (2016)
- 47 Lamb T. D., Collin S. P., Pugh E. N.: Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, S. 960-976 (2007)
- 48 Lenz-Schulte M. und Zylka-Menhorn, V.: Autophagie: „Selbstverstümmelung“ als Überlebensstrategie. *Deutsches Ärzteblatt*, 113 (2016)
- 49 Lewke B.: Einfluss von oxidativem Stress auf die Fluoreszenzlebensdauer des Retinalen Pigmentepithels, bachelor of science Lübeck (2017)
- 50 Lewke B.: Fluoreszenzlebensdauer-Ophthalmoskopie (FLIO) von Mausmodellen der altersbedingten Makuladegeneration (AMD), master of science Lübeck (2020)
- 51 Li J. Q., Welchowski T., Schmid M., Mauschitz M. M.Holz F., Finger R.: Prevalence and incidence of age-related macular degeneration in Europe: a systematic review and meta-analysis. *British Journal of Ophthalmology*, 8, S. 1077-1084 (2019)
- 52 Mauvezin C. und Neufeld T. P.: Bafilomycin A1 disrupts autophagic flux by inhibiting both V-ATPase-dependent acidification and Ca-P60A/SERCA-dependent autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 11, S. 1437-1438 (2015)
- 53 Mitter S. K., Song C., Qi X., Mao H., Rao H., Akin D., Lewin A., Grant M., Dunn W. Jr, Ding J., Bowes Rickman C., Boulton M.: Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy*, 10, S. 1989-2005 (2014)
- 54 Miura Y.: Retinal Pigment Epithelium Organ Culture. In: *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Hsg. Klettner A. K. und Dithmar S., S. 307-324, Springer Verlag, Cham (2020)
- 55 Miura Y., Bernstein P. S., Dysli C., Sauer L., Zinkernagel M.: Fluorophores in the Eye. In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C, S. 35-48, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)
- 56 Miura Y., Klettner A., Noelle B., Hasselbach H., Roeder J.: Change of Morphological and Functional Characteristics of Retinal Pigment Epithelium Cells during Cultivation of Retinal Pigment Epithelium-Choroid Perfusion Tissue Culture. *Ophthalmic Research*, 43, S. 122-133 (2010)
- 57 Miura Y., Lewke B., Hutfilz A., Brinkmann R.: Change in Fluorescence Lifetime of Retinal Pigment Epithelium under Oxidative Stress. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*, 123, S. 105-114 (2019)

- 58 Müller-Esterl W.: Oxidative Phosphorylierung – Elektronentransport und ATP-Synthese. In: Biochemie, Hsg Müller-Esterl W., S. 615-630 (2018)
- 59 Murphy M. P.: Mitochondrial dysfunction indirectly elevates ROS production by the endoplasmic reticulum. *Cell Metabolism*, 18, S. 145-146 (2013)
- 60 Nakashima N., Yoshihara K., Tanaka F., Yagi K.: Picosecond Fluorescence Lifetime of the Coenzyme of D-Amino Acid Oxidase. *The journal of biological chemistry*, 255, S. 5261-5263 (1980)
- 61 Nicholls D. G., Darley-Usmar V. M, Wu M., Jensen P. B., Rogers G. W., Ferrick D. A.: Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells. *Journal of Visualized Experiments*, 46 (2010)
- 62 Pfau N., Kern A. O., Wolfram C., Kalcklösch M.: Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. GBE-Themenheft Blindheit und Sehbehinderung, Robert Koch Institut, Berlin (2017)
- 63 Piippo N., Korhonen E., Hytti M., Kinnunen K., Kaarniranta K., Kauppinen A.: Oxidative Stress is the Principal Contributor to Inflammasome Activation in Retinal Pigment Epithelium Cells with Defunct Proteasomes and Autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49, S. 359-367 (2018)
- 64 Püschel G., Kühn H., Kietzmann T., Höhne W.: Taschenlehrbuch Biochemie, S. 294, Thieme Verlag, Stuttgart (2011)
- 65 Redmann M., Benavides G. A., Berryhill T. F., Wani W. Y., Ouyang X., Johnson M. S., Ravi S., Barnes S., Darley-Usmar V. M., Zhang J.: Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biology*, 11, S. 73-81 (2017)
- 66 Rohowetz L. J., Kraus J. G., Koulen P.: Reactive Oxygen Species-Mediated Damage of Retinal Neurons: Drug Development Targets for Therapies of Chronic Neurodegeneration of the Retina. *International Journal of Molecular Sciences*, 19, (2018)
- 67 Rohrer B., Bandyopadhyay M., Beeson C.: Reduced Metabolic Capacity in Aged Primary Retinal Pigment Epithelium (RPE) is Correlated with Increased Susceptibility to Oxidative Stress. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 854, S. 793-798 (2016)

- 68 Sánchez I., Martin R., Ussa F., Fernandez-Bueno I.: The parameters of the porcine eyeball. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 249, S. 475-482 (2011)
- 69 Sauer L., Andersen K. M., Dysli C., Zinkernagel M. S., Bernstein P. S., Hammer M.: Review of clinical approaches in fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 23, S. 1-20, (2018)
- 70 Schweitzer D., Deutsch L., Klemm M., Jentsch S., Hammer M., Peters S., Haeisen J., Müller U. A., Dawczynski J.: Fluorescence lifetime imaging ophthalmoscopy in type 2 diabetic patients who have no signs of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedical Optics*, 20, (2015)
- 71 Schweitzer D., Schenke S., Hammer M., Schweitzer F., Jentsch S., Birckner E., Becker W., Bergmann A.: Towards metabolic mapping of the retina. *Microscopy research and technique*, 70, S. 410-419 (2007)
- 72 Sigma-Aldrich: Product information - Autophagy Assay Kit - Technical Bulletin, St Louis (2014)
- 73 Sparrow J.R., Hicks D., Hamel C. P.: The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current molecular medicine*, 10, S. 802-823 (2010)
- 74 Strauss O.: The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85, S. 845-881 (2005)
- 75 Szalai E., Nickerson J., Grossniklaus H.: RPE Histopathology and Morphometry. In: *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Hsg. Klettner A. K., Dithmar S., S. 3-17, Springer Nature Switzerland AG, Cham (2020)
- 76 Tawakoli P. N.: Vergleich verschiedener Vitalfärbeverfahren zur Detektion und Quantifizierung adhärenter Mikroorganismen im initialen oralen Biofilm, *Dr. dent.*, Freiburg (2011)
- 77 Thermo-Fisher-Scientific: Calcein AM - User guide, Carlsbad (2020)
- 78 Wahl M.: Time-Correlated Single Photon Counting - technical note, Berlin (2014)
- 79 Welsch U.: *Lehrbuch Histologie*, 4, S. 571-589, Urban & Fischer Verlag, München, (2015)

- 80 Zajac-Pytrus H. M., Pilecka A. Turno-Krecicka A., Adamiec-Mroczek J., Misiuk-Hojlo M.: The Dry Form of Age-Related Macular Degeneration (AMD): The current concepts of pathogenesis and prospects for treatment. *Advances in clinical and experimental medicine*. 24, S. 1099-1104 (2015)
- 81 Zinkernagel M. und Dysli, C.: FLIO Technique and Principles, In: *Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy*. Hsg. Zinkernagel M., Dysli C., Springer Nature Switzerland AG, Cham (2019)

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges	2
Abbildung 2 Schematische Darstellung der Retinaschichten	3
Abbildung 3 Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung verschiedener Funktionen des RPE	5
Abbildung 4 Schematische Darstellung einer Zelle und der beiden wichtigsten ATP-regenerierenden Stoffwechselwege des Menschen	6
Abbildung 5 Darstellung des Elektronentransfers entlang der vier Atmungskettenkomplexe im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung	7
Abbildung 6 Schematische, nicht-maßstabsgetreue Darstellung des Energiestoffwechsels der Retina im Gesunden und AMD-Erkrankten	9
Abbildung 7 Schema des Makroautophagieprozesses	10
Abbildung 8 Jablonski-Diagramm	12
Abbildung 9 Beispielhafte Entwicklung des Fluoreszenzsignals eines Fluorophors in Abhängigkeit der Zeit	13
Abbildung 10 Die Extrazelluläre Ansäuerungsrate und Sauerstoffverbrauchsrate	16
Abbildung 11 Molekulare Wirkorte in der Atmungskette der Im Rahmen der OCR-Messung verwendeten Medikamente	17
Abbildung 12 Beispielhafte OCR-Verlaufskurve einer OCR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyzer	18
Abbildung 13 Beispielhafte ECAR-Verlaufskurve einer ECAR-Messung mittels Seahorse-XF-Analyzer	20
Abbildung 14 Der technische Aufbau von FLIO	22
Abbildung 15 Funktionsprinzip des TCSPC	23
Abbildung 16 FAF- und FLIO-Bilder	24
Abbildung 17 Bilderserie zum Ablauf der Präparation der RPE-Choroidea-Organkultur	27
Abbildung 18 Fluoreszenzmikroskopiebild von mit Calcein gefärbten RPE-Zellen	28
Abbildung 19 Schema der Wirkmechanismen von Bafilomycin A1 auf den Prozess der Makroautophagie	29
Abbildung 20 Messprinzip des Seahorse-XF-Analyzers	30
Abbildung 21 Aufbau der verwendeten ex-vivo RPE/Choroidea-Explantate	31
Abbildung 22 Modifizierung des Versuchsaufbaus von FLIO durch Positionierung eines Spiegels	35
Abbildung 23 Screenshot der FLIO-Analysesoftware SPCImage	37
Abbildung 24 Screenshot des Bildbearbeitungsprogramms Fiji	37
Abbildung 25 RPE-Zellvitalität	39
Abbildung 26 Wirkungsvalidierung des Autophagieinhibitors Bafilomycin A1	40
	67

Abbildung 27 Messung der OCR in pmol/min im Verlauf der Zeit	41
Abbildung 28 Vergleich der mitochondrialen Funktionen	43
Abbildung 29 Messung der ECAR in pmol/min im Verlauf der Zeit	44
Abbildung 30 Vergleich der glykolytische Funktionen	45
Abbildung 31 Beispielhafte farbcodierte FLD-Aufnahmen mittels FLIO	46
Abbildung 32 Messung der τ_m	47
Abbildung 33 Komponentenanalyse des kurzen FLIO-Spektralkanals	48
Abbildung 34 Komponentenanalyse des langen FLIO-Spektralkanals	48
Abbildung 35 Emissionsspektrum von FAD	53
Abbildung 36 Zeitplan der FLD-Messungen an FLIO im Vergleich zu der als Vorlage dienenden Ablauf der OCR-Messung mittels Seahorse XF-Analyzer	69
Abbildung 37 FLD-Änderung im Verlauf unter Einfluss der Wirkstoffe Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin beider Spektralkanäle	70
Abbildung 38 τ_m einer nur mit Medium befüllten Vertiefung zum Vergleich	71
Abbildung 39 Gewählte preferences- und model-Einstellungen	78
Tabelle 1 Absorptions- und Emissionsspektrum sowie Fluoreszenzlebensdauer der wichtigsten Fluorophore der menschlichen Netzhaut	14
Tabelle 2 Wirkstoffkonzentrationen der OCR-Messung	32
Tabelle 3 Wirkstoffkonzentrationen der ECAR-Messung	33

9 Anhang

9.1 Auswirkungen von Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A auf die FLD von ex-vivo RPE

Im Anschluss an die bisher beschriebenen Experimente wurde zusätzlich versucht, herauszufinden, ob die durch die OCR-Messungen beobachteten Auswirkungen der Wirkstoffe Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin A auf den Energiestoffwechsel der RPE-Zellen, ebenfalls einen mit FLIO nachweisbaren Effekt auf deren FLD nach sich ziehen. Die hierbei erzielten Ergebnisse erwiesen sich jedoch als nicht aussagekräftig.

Der Zeitplan der FLD-Messungen orientierte sich an dem Ablauf der OCR-Messung mittels Seahorse XF-Analyzer und ist in Abbildung 35 dargestellt. Während der ersten Experimentphase wird die OCR bzw. FLD des Gewebes in Ruhe gemessen. Anschließend markiert die Gabe der Medikamente Oligomycin, FCCP und Rotenon/Antimycin A jeweils einen neuen Abschnitt des Experiments. Da die FLIO-Messung im Gegensatz zur OCR-Messung, nur an maximal vier Gewebeproben gleichzeitig möglich war und die Zugabe der Wirkstoffe einzeln erfolgte, wurde der Abstand zwischen den FLIO-Messungen und der Wirkstoffzugaben verlängert.

Phase	OCR-Messung (Seahorse)	FLD-Messung (FLIO)
1 Oligomycin	Messzeitpunkte 1 - 6 1. – 44. min	Messzeitpunkte 1 - 2 1. – 20. min
2 FCCP	Messzeitpunkte 7 - 15 53. – 122. min	Messzeitpunkte 3 - 5 30. - 80. min
3 Rotenon, Antimycin A	Messzeitpunkte 16 - 24 131. – 200. min	Messzeitpunkte 6. -8 90. – 140. min
4	Messzeitpunkte 25 - 33 208. – 277. min	Messzeitpunkte 9 -10 150. – 180. min

Abbildung 36 Zeitplan der FLD-Messungen an FLIO im Vergleich zu der als Vorlage dienenden Ablauf der OCR-Messung mittels Seahorse XF-Analyzer, Quelle: eigene Darstellung

Das Ziel war es, die Bedingungen der FLD-Messung, denen der OCR-Messung so gut wie möglich nachzuempfinden, um die Ergebnisse der OCR- und FLD-Messung zeitpunktabhängig auf Korrelation überprüfen zu können. Die Ergebnisse der FLD-Messungen sind in Abbildung 36 dargestellt.

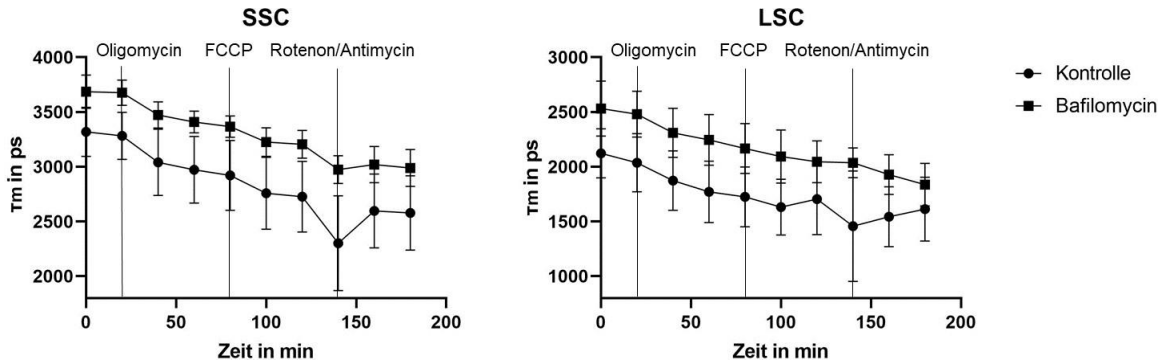


Abbildung 37 FLD-Messungen unter Einfluss der Wirkstoffe Oligomycin, FCCP, Rotenon und Antimycin beider Spektralkanäle: Verglichen werden RPE-Zellen unter Autophagieinhibition (n=6) und eine Kontrollgruppe (n=5). In einer der insgesamt drei Einzelmessungen kam es in der 140. min zu einer Fehlmessung, weshalb hier die Anzahl der untersuchten Organkulturen für beide Gruppen lediglich vier umfasst. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde für beide Diagramme eine unterschiedliche Skalierung der y-Achse gewählt.

Beide der untersuchten Gruppen erreichen im SSC ihren Maximalwert der Messung am ersten Messzeitpunkt. Dieser beträgt 3318,1 ps \pm 224 ps für die nur mit DMSO inkubierte Kontrollgruppe und 3686,4 ps \pm 152,3 ps für die mit dem Autophagieinhibitor behandelte Versuchsgruppe. Im Laufe des Experiments verkürzt sich die τ_m im SSC kontinuierlich. Am zehnten Messzeitpunkt wurde für die Kontrollgruppe eine τ_m von 2577,8 ps \pm 339,9 ps (78 % des Ausgangswertes) und für die Versuchsgruppe eine τ_m von 2988,9 ps \pm 169,5 ps (81 % des Ausgangswertes) gemessen. Der τ_m -Abfall erfolgt nicht linear, sondern weist zwischen den Messzeitpunkten zwei und drei, fünf und sechs und sieben und acht eine auffällig steile negative Steigung auf. Im LSC verkürzt sich die τ_m der Kontrollgruppe von initial 2123,1 ps \pm 252,2 ps auf 1457,3 ps \pm 135,3 ps in der 140. min und verlängert sich daraufhin wieder auf 1612,9 ps \pm 291,5 ps am zehnten Messzeitpunkt. In der Versuchsgruppe verkürzt sich die τ_m von anfänglichen 2530,8 ps \pm 252,2 ps auf 1837,3 ps \pm 195,6 ps am Messzeitpunkt zehn. Die τ_m der Versuchsgruppe war gegenüber der τ_m der Kontrollgruppe in beiden Spektralkanälen durchweg verlängert. Als Erklärung für die zeitlich mit der Wirkstoffgabe korrelierenden τ_m -Verkürzungen, könnte der durch das verwendete Lösungsmittel DMSO verursachte chemische Stress und durch die Medikamentengabe verursachter mechanische Stress dienen. In folgenden Experimenten wurde die DMSO-Konzentration gesenkt, wobei die Extremwerte weiterhin auftraten.

Wie bereits beschrieben, wurde eine Eigenfluoreszenz des verwendeten Mediums festgestellt (Vgl. Abbildung 37). Die FLD der eigentlich statischen Bedingungen verkürzte sich zudem im Laufe des Experiments. Die Ursache hierfür konnte bisher nicht identifiziert werden. Die Verwendung eines nichtfluoreszierenden Mediums verursachte ebenfalls eine ähnliche τ_m -Verkürzung im Laufe des Experiments. Aufgrund dieser Unklarheiten erschienen die gewonnenen Messergebnisse als nicht sinnvoll auswertbar, um einen Zusammenhang zwischen den Medikamentengaben und der FLD-Änderungen feststellen zu können. Es ist eine Optimierung des Verfahrens erwünscht, die eine inhaltliche Auswertung der Daten erlaubt.

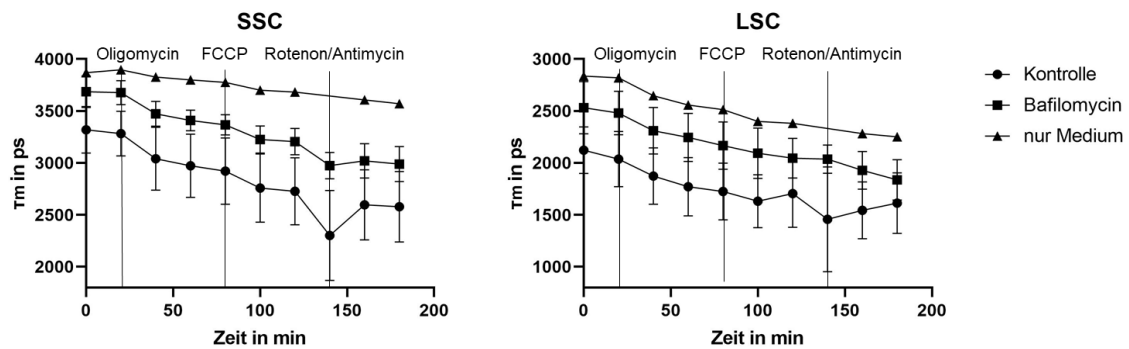


Abbildung 38 τ_m einer nur mit Medium befüllten Vertiefung

9.2 Herstellernachweise

Hersteller	Sitz
Agilent Technologies	Santa Clara, USA
Becton Dickinson	Heidelberg, Deutschland
Berner	Elmshorn, Deutschland
BioSan Sia	Riga, Lettland
Brand	Wertheim, Deutschland
Braun	Melsungen, Deutschland
Dumont	Montignez, Schweiz
DWK Life Sciences	Mainz, Deutschland
Eppendorf	Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Fisher Scientific	Hampton, USA
Geuder GmbH	Heidelberg, Deutschland
Gorenje	Velenje, Slowenien
Greiner Bio-One	Kremsmünster, Österreich
Heathrow Scientific	Vernon Hills, USA
Heidolph	Schwabach, Deutschland
Hermle	Gosheim, Deutschland
Heidelberg Engineering	Heidelberg, Deutschland
Hilgenberg	Malsfeld, Deutschland
Kern & Sohn GmbH	Balingen, Deutschland
Köttermann Labortechnik	Uetze, Deutschland
Liebherr	Bulle FR, Schweiz
Manitowoc	Manitowoc, USA
MeduTex	Bremen, Deutschland
Merck Millipore	Burlington, USA
Microsoft Corporation	Redmond, USA
Molecular Devices	San José, USA
Mundipharma GmbH	Frankfurt am Main, Deutschland
Nano EnTek	Seoul, Südkorea
Nikon	Tokio, Japan
Prior Scientific, Inc.	Rockland, USA
Roth	Graz, Österreich
Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland

Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Thermo Scientific	Waltham, USA
Thorlabs Inc.	Newton, USA
Vitlab	Grossostheim, Deutschland
Zwilling	Solingen, Deutschland

9.3 Geräte und Hilfsmittel

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaughilfen	FTA-1	BioSan Sia
(Divers)	Kataspit 20 Eco	MeduTex
Becherglas	Duran™ Bechergläser mit Ausguss	Fischer Scientific
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson
Feinpinzette	18856	Geuder GmbH
Feischere	545	Hermle
Feuchtbrutschrank	Heracell™ 204i	Thermo Scientific
Flachpinzette	Dumoxel® E	Dumont
Flockeneisbereiter	RF 0244 A	Manitowoc
FLIO	Fluorescence Lifetime Imaging Ophtalmoscope	Heidelberg Engineering
Gewebsschere	19355	Geuder GmbH
Kippschüttler	Polymax 1040	Heidolph
Kühlschränke	Comfort	Liebherr
(Divers)	RF4248W	Gorenje
Messkolben	BLAUBRAND® Messkolben (unterschiedliche Volumina)	Brand
Messzylinder Glas	DURAN® Messzylinder mit Sechskantfuß (unterschiedliche Volumina)	DWK Life Sciences GmbH
Messzylinder Plastik	Messzylinder, PMP, Klasse A	Vitlab
Mikrobiologische Werkbank Klasse 2	Sicherheits- B-[MaxPro] ³ -190	Berner

Mikroskop Hand Teil	PS3J100	Prior Scientific, Inc.
Objekttischmotor		
Mikroskop Hellfeld-Lampe	TI-PS 100 W/A	Nikon
Mikroskop Kamera	Digital Slight DS-U3	Nikon
Mikroskop Lichtquelle	IntensLight C-HG FIE	Nikon
Mikroskop Motor für Objektisch	ProScan III (V31XYZE)	Prior Scientific, Inc.
Pinzette	B-1355 INOX	Zwilling
Pipette 10 µl (grau)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 0.5-10 µl mittelgrau	Eppendorf
Pipette 1000 µl (blau)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 100-1000 µl blau	Eppendorf
Pipette 20 µl (gelb)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 2- 20 µl gelb	Eppendorf
Pipette 200 µl (gelb)	Eppendorf Research® plus, Einkanal, variabel 20- 200 µl gelb	Eppendorf
Skalpell	Cutfix Stainless Sterile Scalpel #21/ #24	Braun
Spiegel (FLIO)	PFSQ20-03-P01 50.8x50,8 Protected silver coated metallic mirror	Thorlabs
Stoffwechselanalysator	Seahorse XFe24 Analyzer	Agilent Technologies
Tischzentrifuge	Sprout™	Heathrow Scientific
Videomikroskop	JuLi™ FL	Nano EnTek
Waage	PCB2000-1	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad		Köttermann Labortechnik
Zentrifuge (groß)	Varifuge 20RS	Heraeus Sepatech
Zentrifuge (klein)	Heraeus Fresco 21 Centrifuge	Thermo Scientific

9.4 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Antimycin A	Sigma-Aldrich
Bafilomycin A1	Cayman Chemical Company Pr.-Nr. 11038
Betaisodona Lösung	Mundipharma GmbH
Calcein-AM	Thermo Fischer Scientific Pr.-Nr. C31100MP
Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose (DMEM)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline w/o CaCl₂/MgCl₂ (PBS⁻)	Sigma-Aldrich
Ethanol	Roth
FCCP	Sigma-Aldrich
D-Glukose	Sigma-Aldrich
Oligomycin	Sigma-Aldrich
Penicillin/ Streptomycin	Sigma-Aldrich
Porcine Serum	Sigma-Aldrich
Rotenon	Sigma-Aldrich
Sodium Pyruvat	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	Sigma-Aldrich
2-DG	Sigma-Aldrich

9.5 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen, schwarz	Sarstedt
Pasteurpipetten (Glas)	Hilgenberg
Pasteurpipetten (Plastik)	Brand
Pipettenspitzen 1 ml (blau)	Sarstedt
Pipettenspitzen 10µl (weiß)	Sarstedt
Pipettenspitzen 200 µl (gelb)	Sarstedt
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 200 µl	Sarstedt
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt

Serologische Pipetten 1 ml (Plastik)	Sarstedt
Serologische Pipetten 10 ml (Plastik)	Sarstedt
Serologische Pipetten 5 ml (Plastik)	Sarstedt
Zellkulturschale 10 cm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 35 mm	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 35 mm sechsfach	Greiner Bio-One
Zellkulturschale 66 mm	Greiner Bio-One

9.6 Kitsysteme

Bezeichnung	Hersteller
Autophagie-Assay–Kit	Sigma Aldrich Katalognummer MAK-138
Seahorse XF Cell Mito Stress Test kit	Agilent technologies Pr.-Nr. 103015-100
Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit	Agilent technologies Pr.-Nr. 103020-100

9.7 Software

Name	Herausgeber	Version
Graphpad Prism 8	Graphpad Software	Version 8.0.0
Heidelberg Eye Explorer (HEYEX)	Heidelberg Engineering GmbH	
Fiji (ImageJ)	National Institutes of Health	ImageJ 1.52n
LabVIEW®	National Instruments	8.6
Mikrosoft Excel	Microsoft Corporation	Excel 2016
NIS-Elements	Nikon	AR 4.1305 64-bit
SPCImage	Becker & Hickl GmbH,	Version 7.4
Wave-controller-software	Agilent technologies	2.4

9.8 Protokolle

Auswertung der FLIO-Ergebnisse mittels SPCImage (Version 7,4)

1. Einzelne Bilder importieren (File → Import)
 2. Für **jeden Channel** Einstellungsparameter manuell auswählen, oder über (conditions → equalize channels) am Ende angleichen:
 - a) **Intensity**-Parameter (Options → Intensity)

Lifetime Image: Brightness and Contrast auf 100%
 - b) **Preferences**-Parameter (Options → Preferences) einstellen:
 - **Deaktivieren** von *Individual channel settings for binning and position*

(x-y Pixelposition sollte dann in die Mitte springen)
 - c) **Model**-Parameter (*Option → Model*) einstellen:
 - *Incomplete Multiexponentials* (Repetition Time Laser: 12,5ns)
 3. Weitere Parameter einstellen:
 - Components: 2
 - Offset: default
 - Pixel Pos. Zentral im Bereich einer Probe:
 - Bin: 1
 - automatic threshold
- b. Alle Bilder inkl. beider Channel sowie Model überprüfen!**
- c. Berechnung (*Calculate → Decay Matrix (all channels)*)
4. Anpassung der Intervallskalierung des Histogramms (Options -> Color -> Min und Max)
 5. Rahmen so ziehen, dass alle Zellproben im Bild sind
 6. Bilder berechnen lassen (calculate → decay matrix(all channels))
 7. Img. Datei erstellen (*File->Save*)
 8. Daten exportieren
(*File -> Export -> Parameter** auswählen -> Export all channels in eigenen Ordner "Export")

*Benötigte Parameter:
 - Color coded value
 - t1, a1[%], t2, a2 [%]
 - Shift, Chi

- IRF, Distribution, ROI,
- Color Coded Image + Legend (Format TIF) , Gray-Scale-Image

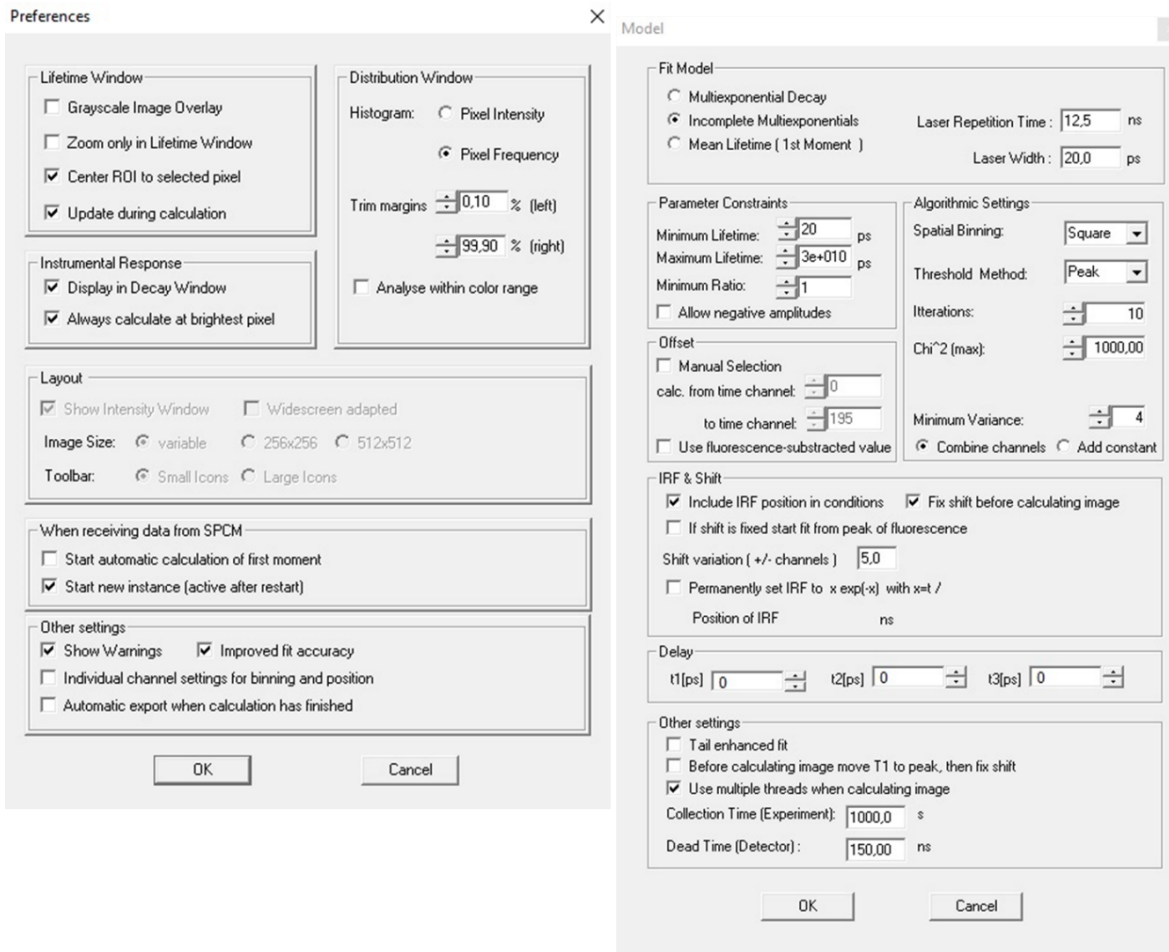


Abbildung 39 Gewählte preferences- und model-Einstellungen:

9. Import der ASC-Datei "color coded value" mit Fiji (ImageJ 1.52n)
10. Auswahl eines Explantats mittels eines kreisförmigen Auswahlwerkzeugs
11. Bestimmung des Mittelwerts in dem ausgewählten Bereich (analyze → measure)
Bei dem nun unter „mean“ angezeigte Wert handelt es sich um die mittlere FLD
12. Wiederholung dieses Vorgangs für beide Spektralkanäle aller Messungen. Durch den Import der ASC-Dateien t1, t2, a1[%] und a2[%] können die Mittelwerte der einzelnen Komponenten T_1 , T_2 , a_1 und a_2 bestimmt werden.

10 Lebenslauf



Persönliche Angaben:

Name: Richard Förster
Geburtsdatum: 06.03.1995
Geburtsort: Lutherstadt Wittenberg

Ausbildung:

Oktober 2020 Zweites Staatsexamen
SS 2019 Promotionssemester
WS 2017/2018 Erasmusaufenthalt an der medizinischen Fakultät der
und SS 2018 Universität zu Bergen
August 2016: Erstes Staatsexamen
Oktober 2014: Immatrikulation zum Studium der Humanmedizin an der
 Universität zu Lübeck
Juni 2014: Abitur am Gymnasium Philanthropinum Dessau
2011/2012 Schüleraustausch Kalifornien/USA mit Rotary Youth Exchange

Zeitraum der Dissertation: März 2019 – Dezember 2021

Lübeck, den 15.02.2021

11 Danksagung

Ich danke meiner Doktormutter Priv.- Doz. Dr. med Yoko Miura für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die wertvolle Unterstützung bei der Planung und Auswertung meiner Experimente. Trotz Belastung in Klinik und Forschung gelang es ihr mit viel Engagement, mir die Umsetzung dieser Arbeit zu ermöglichen. Ich habe mich in dem gesamten Zeitraum von ihr hervorragend betreut gefühlt.

Ferner danke ich Dr. Erdal Tan Ishizuka für die Einarbeitung im Labor. Ich danke für die professionelle Vermittlung der für die Explantatgewinnung und OCR-Messungen notwendigen Fähigkeiten sowie die vielen aufmunternden und motivierenden Worte.

Sigrid Pätzmann und Dr. Kensuke Shima gebührt Dank für die Unterweisung am Seahorse-XF-Analyszer und die Unterstützung bei der Interpretation der Messergebnisse.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern des Instituts für biomedizinische Optik für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere danke ich Astrid Link, Britta Lewke, Katharina Kern und Paula Enzian für ihre Ratschläge und Hilfsbereitschaft.

Schlussendlich möchte ich mich bei meinen Eltern, Heike und Gerd Förster, für ihre uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung bedanken, die mir das Studium der Humanmedizin erst ermöglichte.