

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Analyse von retinalen Pigmentepithelzellen retinaler Organoide

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ricarda Bühler

2025

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Analyse von retinalen Pigmentepithelzellen retinaler Organoide

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ricarda Bühler

2025

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Erfordernis eines aktuellen Modellsystems des Auges in der Forschung	6
1.2 Entwicklung der neuronalen Retina und des RPE <i>in vivo</i>	6
1.3 Lage und Funktionen des RPE <i>in vivo</i>	7
1.4 Modellsysteme der Retina in der Stammzellforschung und deren Grenzen	9
1.4.1 Einsatz von Stammzellen	9
1.4.2 iPS-Modellsysteme der Retina – Retinale Organoide.....	10
1.4.3 Co-Kultur von retinalen Organoiden und RPE: ein vielversprechender Ansatz.....	13
1.5 Ziele dieser Arbeit	15
2. Material.....	17
2.1 Eukaryotische Zelllinien	17
2.2 Reagenzien und Chemikalien	17
2.3 Primär- und Sekundärantikörper	19
2.4 Molekularmassenstandard	20
2.5 Enzyme	20
2.6 Kit-Systeme.....	20
2.7 Oligonukleotide	20
2.8 Zellkulturmateriale.....	21
2.9 Puffer und Lösungen.....	23
2.10 Verbrauchsmaterial.....	24
2.11 Geräte	27
2.12 Software	29
3. Methoden	30

3.1 Differenzierung der iPS-Zellen zu retinalen Organoiden und bRPE-Zellen	30
3.1.1 Differenzierungsprotokoll	30
3.1.2 Weitere Differenzierung der retinalen Organoide	33
3.1.3 Weitere Differenzierung der bRPE-Zellen.....	34
3.1.4 Konservierung der bRPE-Zellen	35
3.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien	36
3.2.1 Kultivierung der iPS-Zellen und Sicherung von Zellpellets zur Isolation der RNA.....	36
3.2.2 Konservierung der iPS-Zellen.....	37
3.2.3 Kultivierung der kryokonservierten RPE-Zellen	37
3.3 Immunzytochemischer Nachweis von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1.....	39
3.4 Messung des TEER	40
3.5 Isolierung und Phagozytose von porzinen POS	41
3.5.1 Isolierung von porzinen POS und Bestimmung der Konzentration	41
3.5.2 POS-Phagozytose	42
3.6 Nachweis über die Phagozytose von porzinen POS	42
3.6.1 Gewinnung von Proteinproben	42
3.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese	43
3.6.3 Western Blot-Analyse	44
3.7 Quantitative Analyse der mRNA-Expression von RPE-Marker-Genen	45
3.7.1 Isolation der mRNA	45
3.7.2 Synthese der cDNA	47
3.7.3 mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR).....	48
3.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten.....	49

4. Ergebnisse	50
4.1 Differenzierung der iPS-Zellen zu bRPE-Zellen und retinalen Organoiden	50
4.2 Charakterisierung der bRPE-Zellen	50
4.2.1 Anstieg des TEER	50
4.2.2 Expression und korrekte Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1	52
4.2.3 Phagozytose-Experimente mit porzinen POS.....	56
4.2.4 Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen.....	57
5. Diskussion	62
5.1 Zuverlässigkeit des Protokolls zur Differenzierung der iPS-Zellen zu bRPE-Zellen und retinalen Organoiden.....	63
5.2 Demonstration charakteristischer Eigenschaften von RPE-Zellen	68
5.2.1 Anstieg des TEER auf physiologische Werte	68
5.2.2 Expression und Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1	68
5.2.3 Phagozytose-Nachweis von porzinen POS	69
5.2.4 Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen.....	70
5.3 Einfluss der Kryokonservierung und der Zellkulturmedien auf die bRPE-Zellen.....	72
6. Zusammenfassung.....	77
7. Literaturverzeichnis	79
8. Abkürzungsverzeichnis	102
9. Abbildungsverzeichnis	104
10. Tabellenverzeichnis	104
11. Appendix	106
12. Danksagung.....	
Eidesstattliche Erklärung.....	

1. Einleitung

1.1 Erfordernis eines aktuellen Modellsystems des Auges in der Forschung

Große Fortschritte in der Stammzellforschung innerhalb der letzten zwei Dekaden ermöglichen verschiedene vielversprechende Modellsysteme des Auges zu entwickeln. Diese Modellsysteme spielen eine Schlüsselrolle zum besseren Verständnis verschiedener Erkrankungen des Augenhintergrundes durch Aufdeckung der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Darüber hinaus bieten Stammzellen die Chance, retinale Transplantate zu generieren, die zur Therapie von degenerativen Augenerkrankungen eingesetzt werden können (1–4). Trotz solcher beeindruckender Entwicklungen in der Netzhautforschung litten nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation 2019 weltweit über eine Milliarde Menschen an Sehbeeinträchtigung oder Erblindung (5). Durch das Bevölkerungswachstum, den demographischen Wandel und die Urbanisierung wird die Anzahl an Personen, die von Sehschwäche, Sehbeeinträchtigungen oder Erblindung betroffen sein werden, in den kommenden Jahrzehnten zudem weiter stark zunehmen und damit erhebliches Leid, aber auch hohe Kosten im Gesundheitswesen verursachen (5). Die Rekonstruktion einer komplex aufgebauten neuronalen Retina einschließlich retinalem Pigmentepithel (RPE) ist bisher *in vitro* jedoch nicht gelungen (6). Sowohl die Reifung als auch die Funktionalität der neuronalen Retina werden aber entscheidend vom RPE beeinflusst (7). Da degenerative Netzhauterkrankungen den Untergang von RPE-Zellen und/oder Zellen der neuronalen Retina zur Folge haben (8), wird sowohl zum besseren Verständnis dieser Erkrankungen als auch zu deren Therapie dringend ein Modellsystem des Auges nach dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik benötigt.

1.2 Entwicklung der neuronalen Retina und des RPE *in vivo*

Während der Embryogenese entstehen die neuronale Retina und das RPE aus Neuroektoderm, welches einen embryonalen Augenbecher mit einem räumlich getrennten äußeren und inneren Blatt formiert (**Abbildung 1 A, B**) (9). Durch Annäherung beider Blätter zwischen Tag 37 und Tag 42 *post conceptionem*

entwickelt sich aus dem inneren Blatt die neuronale Retina und aus dem äußeren das RPE (**Abbildung 1 C**) (9,10). Die weitere funktionelle und physiologische Reifung beider Gewebe ist dabei eng zwischen diesen orchestriert. So sezerniert das RPE während der Embryogenese verschiedene Faktoren, die die Reifung von Photorezeptoren fördern und deren Überleben sichern (11–14). Die Photorezeptoren wiederum regulieren zum Beispiel die Verteilung von Integrinen in der apikalen Membran von RPE-Zellen während der frühen Entwicklungsphase, welche entscheidend für einen Stoffaustausch zwischen den Zellen sind (15).

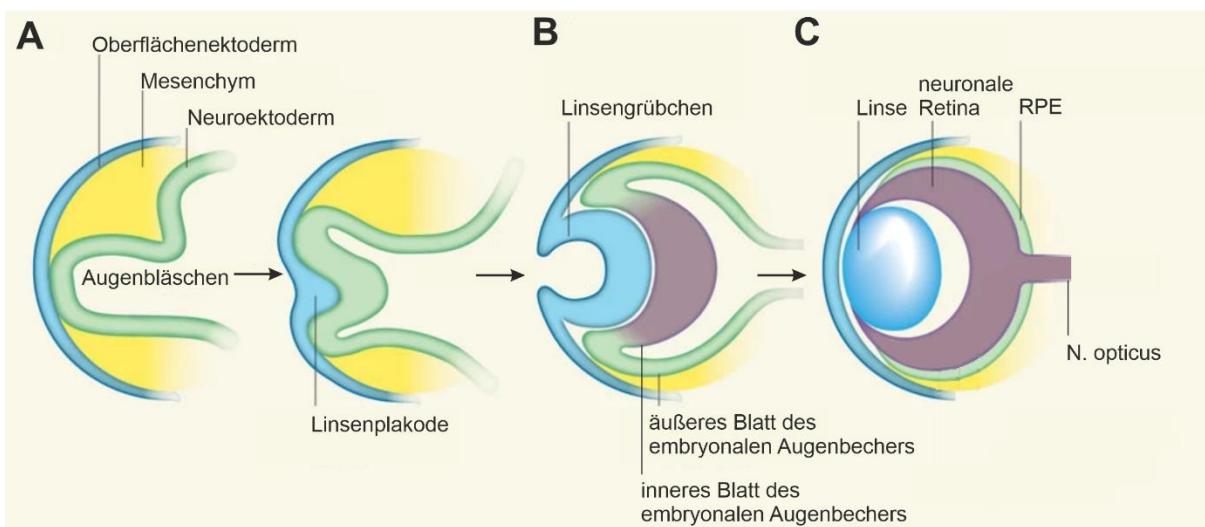


Abbildung 1: Schematische Zeichnung der embryonalen Entwicklung des Auges

(A) Während der frühen Phase der Embryogenese verdickt sich das Oberflächenektoderm an der Kontaktstelle zum Neuroektoderm des Augenbläschens zur Linsenplakode. (B) Anschließend entwickelt sich aus dem Augenbläschen der doppelwandige embryonale Augenbecher mit einem inneren und äußeren Blatt. Zwischen dem 37. und 42. Tag *post conceptionem* nähern sich die beiden Blätter des embryonalen Augenbechers an (C). Aus dem inneren Blatt entwickelt sich die neuronale Retina aus dem äußeren das RPE. (Abbildung angepasst aus Ali & Sowden (2011); (9))

1.3 Lage und Funktionen des RPE *in vivo*

In vivo grenzt das einschichtige RPE mit seiner basolateralen Membran an die Bruch-Membran, welche das RPE von fenestrierten Endothel der Choroidea absetzt (**Abbildung 2**) (11). Seine apikale Membran bildet ein dichtes Netz aus Mikrovilli, das die Photorezeptoraußensegmente (*photoreceptor outer segment*, POS) umschließt. Neben seinem entscheidenden Beitrag für die Reifung der Photorezeptoren erfüllt das RPE verschiedenste Funktionen, die dazu dienen, die retinale Homöostase

aufrecht zu erhalten (**Abbildung 2**). So schützt es mit seinem hohen Gehalt an Melanosomen, die Melanin oder Lipofuszin enthalten (16), die Photorezeptoren als lichtempfindliche Sinneszellen des Auges vor Streulicht (17). Weiterhin reguliert es als Teil der Blut-Retina-Schranke den Ionen-, Nährstoff- und Metabolit-Transport zwischen Choroidea und Photorezeptoren (17).

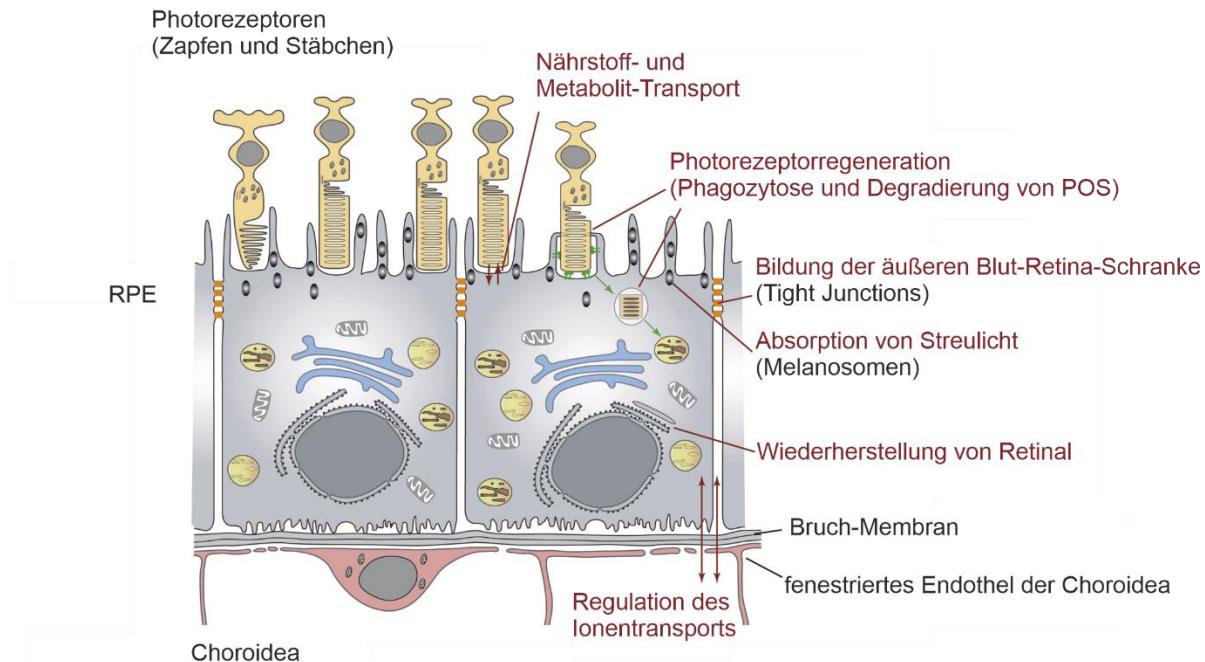


Abbildung 2: Schematische Zeichnung des RPE mit Darstellung seiner Funktionen

Die verschiedenen Zellschichten und -strukturen (in schwarzer Schrift) und die verschiedenen Funktionen des RPE (in roter Schrift) sind dargestellt. Apikal umschließt das RPE mit seinen Mikrovilli die POS. Die basolaterale Membran des RPE grenzt unmittelbar an die Bruch-Membran. Neben der Regulation des Ionen-, Nährstoff- und Metabolit-Transports absorbiert das RPE Streulicht und bildet mit seinen Tight Junctions die äußere Blut-Retina-Schranke. Außerdem ist es durch die Phagozytose und Degradierung von verbrauchten Membranfragmenten der POS und der damit verbundene Wiederherstellung von 11-cis-Retinal aus all-trans-Retinal wesentlich an der Aufrechterhaltung des Sehprozesses beteiligt. (Abbildung angepasst aus Lehmann et al. (2014); (17))

Die wichtigste Aufgabe des RPE ist die Phagozytose von verbrauchten Membranfragmenten der POS und die damit verbundene Regenerierung von 11-cis-Retinal aus all-trans-Retinal zur Aufrechterhaltung der Phototransduktionskaskade (17). Voraussetzung zur Erfüllung dieser essenziellen Aufgaben ist der polare Aufbau des Epithels, der durch eine asymmetrische Protein Zusammensetzung zwischen der apikalen und basolateralen Membran und durch die Bildung von Tight Junctions erreicht wird (17,18). So exprimiert das RPE apikal unter anderem verstärkt die Natrium-Kalium-ATPase, die zur Aufrechterhaltung des elektrischen Gradienten dient

(7,19). Außerdem wird apikal-lateral das Zonula Occludens Protein 1 (ZO-1) als Bestandteil von Tight Junctions auf der cytoplasmatischen Seite der RPE-Zellen exprimiert (20). Basolateral wird dagegen der Ca^{2+} -aktivierte Chloridkanal Bestrophin-1 (BEST1) verstärkt in die Plasmamembran eingebaut (19).

1.4 Modellsysteme der Retina in der Stammzellforschung und deren Grenzen

1.4.1 Einsatz von Stammzellen

Stammzellen sind Körperzellen, die ein unterschiedliches Potential besitzen sich in verschiedene Zell- und Gewebetypen auszudifferenzieren (21). Nach ihrem Differenzierungspotential können sie in fünf Gruppen eingeteilt werden: totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent und unipotent (22). Während totipotente Stammzellen sowohl embryonales als auch extraembryonales Gewebe bilden können (23), sind pluripotente Stammzellen dazu in der Lage, zu allen drei Keimblättern (Ektoderm, Mesoderm, Entoderm) und damit zu allen Zell- und Gewebetypen des Körpers auszudifferenzieren (24). Multipotente Stammzellen können sich dagegen nur innerhalb eines Gewebetyps in verschiedene Zelltypen differenzieren, oligopotente Stammzellen in wenige Zelltypen innerhalb eines Gewebetyps und unipotente Stammzellen sind lediglich dazu in der Lage, Zellen desselben Typs zu bilden (22). Als 1998 erstmals pluripotente humane embryonale Stammzellen (*human embryonic stem cells*, hESC) aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste isoliert wurden (25), eröffneten sich der medizinischen Forschung damit überragende neue Chancen. So können sich diese Zellen *in vitro* selbst erneuern, behalten auch nach längerfristiger Kultivierung ihre Pluripotenz und können gerichtet in verschiedenste Zelltypen ausdifferenziert werden (26). Die Forschung an hESC ist jedoch ethisch umstritten und gesetzlich streng reglementiert (27). Eine echte Alternative entstand, als es Takahashi und Yamanaka (28) 2006 gelang, induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) mithilfe künstlicher Reprogrammierung von somatischen Mauszellen herzustellen. Durch retrovirale Transfektion von Fibroblasten mit den vier Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4 konnten nun auch adulte Zellen in einen pluripotenten Stammzell-Status zurückversetzt werden. Nicht einmal 1 Jahr später konnte die Wiederherstellung der Pluripotenz mit dem gleichen Verfahren unabhängig von verschiedenen

Forschergruppen auch für humane adulte Fibroblasten demonstriert werden (29–31). Während das Transkriptionsprofil von hESC und iPS-Zellen nahezu identisch ist (32,33), zeigen iPS-Zellen im Gegensatz zu hESC ein epigenetisches Gedächtnis (34,35). Vor allem in den ersten Passagen der iPS-Zellen entspricht deren DNA-Methylierung eher der ihres Ursprungsgewebes (34,35). Lister et al. (36) konnten aber auch in hohen Passagen und nach Ausdifferenzierung der iPS-Zellen zu Trophoblasten persistierende Veränderungen hinsichtlich der DNA-Methylierung der iPS-Zellen feststellen. Da iPS-Zellen von adulten Zellen abgeleitet werden, ist zudem die Wahrscheinlichkeit, dass die gespendeten somatischen Zellen bereits verschiedene genetische Mutationen akkumuliert haben, im Gegensatz zu hESC erhöht (37). Hinsichtlich der klinischen Anwendung besitzen iPS-Zellen neben dem ethisch eher unbedenklichen Einsatz einen weiteren bedeutenden Vorteil gegenüber hESC: Bei Verwendung von Transplantaten, die aus iPS-Zellen des Patienten ex vivo generiert und anschließend reimplantiert werden, kann auf eine lebenslange immunsuppressive Therapie mit all ihren Nebenwirkungen verzichtet werden (21). Die große Bedeutung der iPS-Zellen für die Forschung wurde 2012 durch Vergabe des Nobelpreises für Physiologie oder Medizin an Prof. Shin'ya Yamanaka unterstrichen (38).

1.4.2 iPS-Modellsysteme der Retina – Retinale Organoide

Anfänglich wurden auf dem Gebiet der Netzhaut-Forschung aus iPS-Zellen zweidimensionale, adhärente Zellkulturen aus RPE-Zellen und Photorezeptoren ausdifferenziert (39,40). Die verschiedenen Zelltypen entwickelten sich dabei jedoch ohne direkten Kontakt nebeneinander auf benachbarten Arealen der Zellkulturplatte (39,40). Eine realistischere Nachbildung der Retina gelang 2011 auf Grundlage der bahnbrechenden Arbeit von Yoshiki Sasai und seiner Arbeitsgruppe, die aus hESC von Mäusen erstmalig dreidimensionale retinale Organoide ausdifferenzierten konnten. Unter Anpassung eines Protokolls zur Generierung von frei im Zellkulturmedium schwimmenden *Embryoid Bodies* (embryonale Körperchen) konnte die spontane Formation von embryonalen Augenbechern mit neuronaler Retina und RPE-Zellen demonstriert werden (41). Seitdem wurde dieses Protokoll unabhängig von verschiedenen Forschergruppen zur Generierung von humanen retinalen Organoiden angepasst und optimiert (42–48). Die auch als „Auge in der Zellkulturschale“ bezeichneten retinalen Organoide spiegeln in vielen Aspekten

sowohl zeitlich als auch räumlich die menschliche embryonale Entwicklung des Auges wider (49). Im Gegensatz zu den zuvor zweidimensionalen Kulturen, bilden retinale Organoide alle Hauptzelltypen der neuronalen Retina in ihrer typischen Schichtung aus. (**Abbildung 3 A, B**).

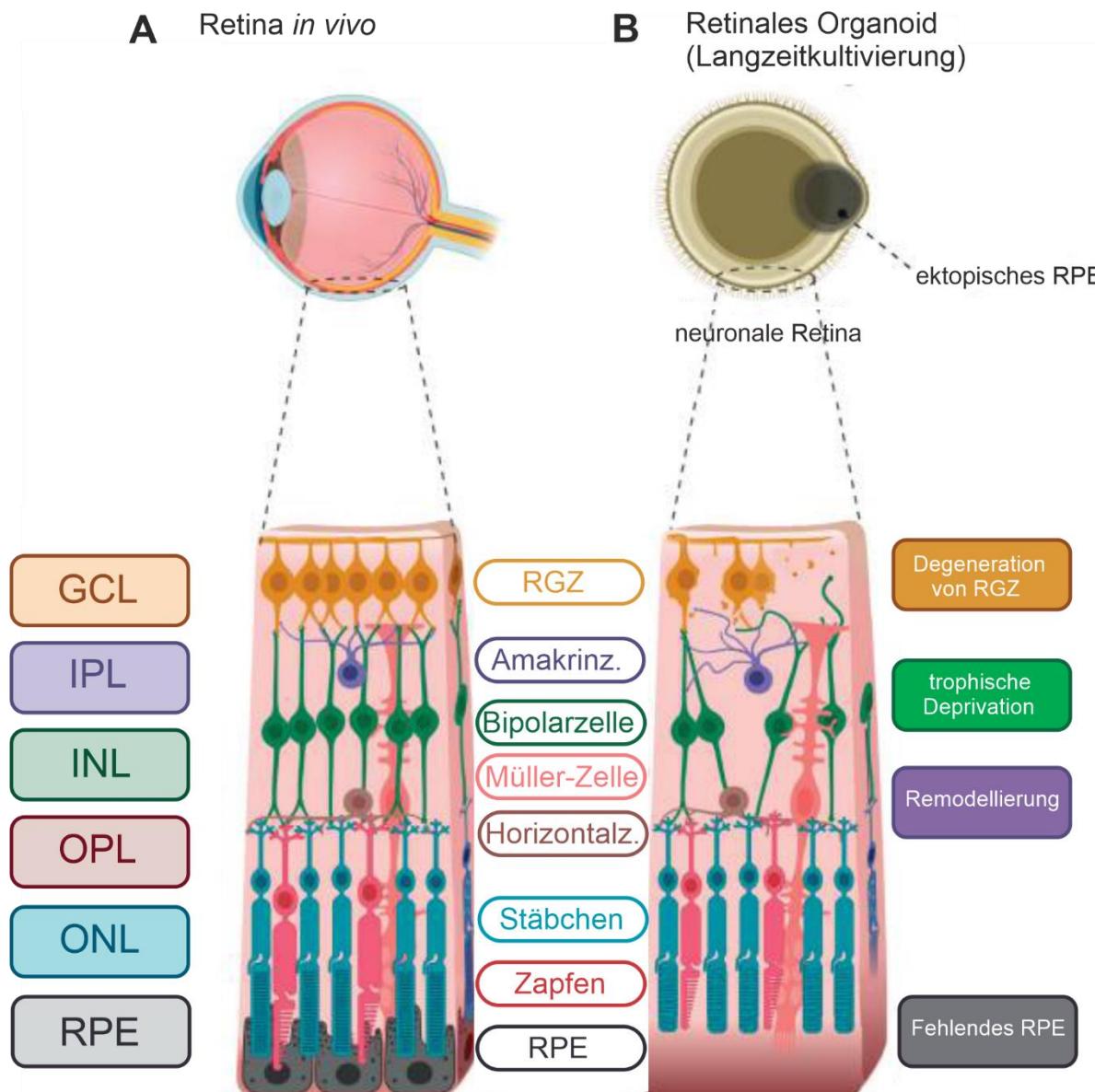


Abbildung 3: Schematische Zeichnung der Schichten und Zelltypen der menschlichen Retina und eines retinalen Organoids

(A) Die Zellschichten der Retina sind links benannt. Eingezeichnet sind: RPE, ONL (*outer nuclear layer*; äußere nukleäre Schicht), OPL (*outer plexiform layer*; äußere plexiforme Schicht), INL (*inner nuclear layer*; innere nukleäre Schicht), IPL (*inner plexiform layer*; innere plexiforme Schicht) und GCL (*ganglion cell layer*; retinale Ganglienzellschicht). Mittig sind den einzelnen Zellschichten die sieben Hauptzelltypen der Retina zugeordnet: RPE, Photorezeptoren (Stäbchen, Zapfen), Horizontalzellen, Müller-Zellen, Bipolarzellen, Amakrinzellen und RGZ (retinale Ganglienzellen). (B) Rechts ist die Zellschichtung eines retinalen Organoids dargestellt. Bei

Langzeitkultivierung sinkt die Anzahl der retinalen Ganglienzellen wahrscheinlich bedingt durch einen Mangel an neurotrophen Faktoren progressiv. Darauffolgend gehen vermutlich Interneuronen zugrunde und es kann eine Remodellierung des Gewebes beobachtet werden. Retinale Organoide bilden RPE zudem nur ektopisch als kugelförmige mehrschichtige Struktur aus. (Abbildung angepasst aus O'Hara-Wright & Gonzalez-Cordero (2020); (50))

Des weiteren entwickeln Photorezeptoren in retinalen Organoiden die sogenannten Ribbon-Synapsen (48,51–53). Diese bilden in der äußeren plexiformen Schicht der Retina Verbindungen zu Dendriten von Horizontalzellen und Bipolarzellen und sind damit entscheidend an der Weiterleitung von visuellen Informationen zu den Ganglienzellen beteiligt (48,54). Zusätzlich besitzen retinale Organoide die Fähigkeit zur Phototransduktion *in vitro* (55). Alle dafür benötigten Proteine und Strukturen (POS und Photorezeptorinnensegmente) konnten ebenso in retinalen Organoiden nachgewiesen werden (47,48,52,53,55). Ungeachtet des sehr beeindruckenden, komplexen Aufbaus von retinalen Organoiden haben diese aber auch Schwächen, die bisher noch nicht behoben werden konnten (**Abbildung 3 B**). So sind retinale Ganglienzellen zwar die ersten, die in retinalen Organoiden etwa ab dem 50. Tag der Differenzierung zelltyp-spezifische Marker-Gene exprimieren, ab dem 90. Tag der Differenzierung gehen sie jedoch progressiv verloren (47,56). Als mögliche Ursachen werden einerseits die schlechte Nährstoffversorgung durch passive Diffusion aufgrund der zentrale Lage der retinalen Ganglienzellschicht innerhalb des Organoides genannt (50), andererseits die fehlenden bidirektionalen neuronalen Projektionen der retinalen Ganglienzellen zu nachgeschalteten kortikalen Zentren (57). Eine Studie von Fligor et al. (58) konnte demonstrieren, dass eher die fehlenden neuronalen Projektionen die entscheidende Erklärung für den progressiven Verlust der retinalen Ganglienzellen darstellen. So fusionierten sie retinale Organoide am 50. Tag der Differenzierung mit Gehirn-Organoiden. Die retinalen Ganglienzellen proliferierten dadurch unter anderem verstärkt und am 150. Tag der Differenzierung zeigte sich bei den fusionierten retinalen Organoiden ein signifikant geringerer Verlust von retinalen Ganglienzellen (58). Eine weitere Schwäche von retinalen Organoiden ist ihr Entwicklungsstadium, welches auch nach Langzeitkultivierung nicht über ein fetales Stadium hinausreicht (59). Die komplexe Anordnung von Stäbchen und Zapfen und die intrazelluläre Vernetzung der adulten Retina *in vivo* konnten bisher nicht erreicht werden (60). Allerdings muss hier angemerkt werden, dass sich die Entwicklung der menschlichen Retina auch

postnatal fortsetzt (61). Da retinale Organoide, wie bereits erwähnt, zeitlich die menschliche embryonale Entwicklung des Auges nachbilden, müssten sie systematisch über mindestens neun Monate bis mehrere Jahre untersucht werden, um hier konkretere Aussagen über das erreichbare postnatale Entwicklungsstadium treffen zu können. Der offensichtlichste Unterschied zur Retina *in vivo* ist aber wohl das fehlende einschichtige RPE gegenüber der POS. Im Gegensatz zur Embryonalentwicklung nähern sich die beiden Blätter des embryonalen Augenbechers bei retinalen Organoiden während der Differenzierung nicht an. Nur manchmal wird RPE ektopisch als kugelförmige, mehrschichtige Struktur ausgebildet (**Abbildung 3 B**) (49,50). Mögliche Ursachen für diese entscheidende Abweichung von der regulären Embryogenese sind die fehlende parakrine Zellkommunikation und die mangelnden Zugkräfte durch das umgebende Gewebe (49). Als unmittelbare Konsequenzen sind die Photorezeptoren in retinalen Organoiden zum einen nicht vor Scherkräften geschützt, zum anderen fehlen die oben beschriebenen unterstützenden Funktionen des RPE, wie die Phagozytose verbrauchter Membranfragmente der POS. Zur Erforschung von multifaktoriellen Augenerkrankungen wie der altersabhängigen Makuladegeneration, der diabetischen Retinopathie oder dem Glaukom, deren Entwicklung mit komplexen Interaktionen zwischen Chorioidea, RPE und Photorezeptoren assoziiert wird, sind retinale Organoide zum jetzigen Zeitpunkt eher begrenzt geeignet (62).

1.4.3 Co-Kultur von retinalen Organoiden und RPE: ein vielversprechender Ansatz

Trotz des Wissens um die wichtige physiologische Beziehung zwischen Photorezeptoren und RPE wurden bisher wenige Versuche unternommen, diese *in vitro* wieder zu vereinen. So kultivierten Akhtar et al. (63) je 5 bis 7 retinale Organoide über einen Zeitraum von 2 Wochen mit RPE-Zellen von Mäusen. Zur Co-Kultur setzte die Forschungsgruppe retinale Organoide ein, die sich entweder in einem frühen (Woche 3 bis 6 der Differenzierung) oder späten (Woche 19 bis Woche 23 der Differenzierung) Entwicklungsstadium befanden. Sie konnten zeigen, dass eine Co-Kultur der retinalen Organoide mit RPE-Zellen die Entwicklung von Photorezeptoren im frühen Stadium der Differenzierung förderte und im weiteren Verlauf deren Reifung beschleunigte. Um zu beweisen, dass für diesen positiven Einfluss ein direkter physiologischer Kontakt zwischen RPE und retinalen

Organoiden notwendig ist, setzen sie retinalen Organoiden täglich konditioniertes Medium von RPE-Zellen zu. Dieses enthielt zwar die von RPE-Zellen sezernierten Faktoren, erhöhte aber im Gegensatz zu dem direkten Kontakt der beiden Zelltypen während der Co-Kultivierung nicht die Genexpression des Photorezeptor-spezifischen Gens *RCVRN*. Eine physiologische Interaktion zwischen RPE-Zellen und Photorezeptoren wurde hier jedoch nicht nachgewiesen. Ebenso bleibt offen, warum keine humanen RPE-Zellen zur Co-Kultur eingesetzt wurden und weshalb die RPE-Zellen nicht polar auf Transwell-Filters eingesetzt wurden. Erst 8 Jahre nach der ersten erfolgreichen Ausdifferenzierung von retinalen Organoiden gelang Achberger et al. (64) eine Co-Kultivierung von retinalen Organoiden und RPE aus iPS-Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen. Sie verwendeten Mikrochips, die getrennt durch eine poröse Membran, in eine obere Kammer für die Zellen und eine untere Kammer für das Zellkulturmedium aufgeteilt waren. Durch diesen Aufbau konnte das Medium ähnlich der physiologischen Perfusion zu- und abgeleitet werden. Nachdem die RPE-Zellen, die zuvor vom ektopischen RPE der retinalen Organoide isoliert wurden, am Boden der oberen Kammer ein konfluentes, einschichtiges Epithel gebildet hatten, wurde ein retinales Organoid in die Kammer eingesetzt. Zur Stabilisierung des Kontaktes zwischen Photorezeptoren und RPE wurde zuvor eine Schicht Hydrogel auf die RPE-Zellen gegeben. Das auf Hyaluronsäure basierende Gel hatte dabei laut den Autoren eine ähnliche Zusammensetzung wie die von den Photorezeptoren und RPE-Zellen *in vivo* gebildete Interphotorezeptormatrix. In diesem Co-Kultur-Modell phagozytierten die RPE-Zellen die verbrauchten Membranfragmente der POS des retinalen Organoids, womit erstmals die physiologische Interaktion der zwei Zelltypen *in vitro* demonstriert werden konnte. Allerdings erfordert dieser Ansatz den Einsatz von speziellen, komplexen technischen Hilfsmitteln, wodurch die Reproduzierbarkeit erschwert wird. Vermutlich wurde ein vergleichbares Co-Kultur-Modell aus diesem Grund bisher lediglich in einer weiteren Forschungsarbeit von Su et al. (65) eingesetzt. In Anlehnung an Achberger et al. (64) nutzte die Forschergruppe mit Medium perfundierte Mikrochips zur Co-Kultivierung von retinalen Organoiden und RPE-Zellen, die aus iPS-Zellen eines Patienten mit einer spezifischen Unterform aus der heterogenen Gruppe der Netzhauterkrankungen Retinitis Pigmentosa ausdifferenziert wurden. Nach 30 Tagen Co-Kultur konnte im Vergleich zu konventionellen Zellkulturbedingungen unter anderem eine erhöhte Überlebensrate der retinalen Organoide und eine stärkere Pigmentierung der RPE-Zellen beobachtet

werden. Die Autoren bezeichnen die Co-Kultivierung der beiden Zelltypen auf den perfundierten Mikrochips daher als vielversprechendes und nützliches Werkzeug zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. Eine weitere Einschränkung des Co-Kultur-Modells nach Achberger et al. (64) ist jedoch die begrenzte Fläche des möglichen direkten physiologischen Kontaktes zwischen den zweidimensional kultivierten RPE-Zellen und den dreidimensionalen retinalen Organoiden (57). Dieses Problem versuchten Berber et al. (66) zu addressieren. Die Forschergruppe entwickelte sechs verschiedene Co-Kultur-Modelle und untersuchte diese hinsichtlich einer beobachtbaren physiologischen Interaktion zwischen retinalen Organoiden und RPE-Zellen, die zuvor aus derselben iPS-Zelllinie generiert wurden. Unter anderem suspendierten sie RPE-Zellen in Matrigel-GFR undbetteten die retinalen Organoide darin ein. Während anfänglich ein enger physischer Kontakt zwischen den RPE-Zellen und den retinalen Organoiden beobachtet werden konnte und Aufnahmen mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop darauf hinweisen, dass die RPE-Zellen in der frühen Phase der Co-Kultivierung zwischen den ersten 4 und 24 Stunden POS phagozitiert haben, zeigten sich bereits nach 7 Tagen wieder größere räumliche Abstände zwischen den RPE-Zellen und den retinalen Organoiden.

1.5 Ziele dieser Arbeit

Eine langfristig stabile Co-Kultur von retinalen Organoiden und RPE wäre ein nächster Schritt zur Verbesserung des *in vitro* Modellsystems einer Netzhaut. Die gleichzeitige Generierung von RPE und retinalen Organoiden aus derselben Stammzelllinie mit einem Differenzierungsprotokoll bietet durch die damit garantierte identische epigenetische Herkunft der Zellen hierzu optimale Voraussetzungen. Zusätzlich könnte dieser Ansatz zu einer Minimierung des Ressourcenverbrauchs beitragen.

Am Institut für Humangenetik Regensburg wurde das bereits existierende Differenzierungsprotokoll für retinale Organoide so angepasst, dass als Nebenprodukt RPE (*byproduct* RPE, bRPE) gewonnen werden kann. In einer Vorarbeit konnte gezeigt werden, dass mit dem angepassten Protokoll gleichzeitig bRPE-Zellen und retinale Organoide generiert werden können. Das bRPE weist zudem die typische Pigmentierung und die hexagonale Morphologie von RPE-Zellen *in vivo* auf (67).

Im ersten Teil der Arbeit sollte die zuverlässige Generierung von bRPE mithilfe des angepassten Protokolls durch insgesamt 5 weitere Differenzierungen ausgehend von je 2 Klonen dreier iPS-Zelllinien bestätigt werden. Die iPS-Zellen stammten von gesunden Spendern.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte gezeigt werden, dass das aus den iPS-Zellen gewonnenen bRPE charakteristische Eigenschaften von RPE-Zellen aufweist. Die in der Vorarbeit (67) differenzierten bRPE-Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression von verschiedenen RPE-Marker-Proteinen und -Genen mittels Immunzytochemie (*Immunocytochemistry*, ICC) und quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (*quantitative real-time polymerase chain reaction*, qRT-PCR) analysiert. Außerdem wurde der transepitheliale elektrische Widerstand (*transepithelial electrical resistance*, TEER) der bRPE-Zellen und ihre Fähigkeit zur Phagozytose von POS näher untersucht. Zusätzlich wurden die bRPE-Zellen mit RPE-Zellen verglichen, die nach dem am Lehrstuhl für Humangenetik Regensburg etablierten Protokoll von Krohne et al. (68) mit Anpassungen nach Brandl et al. (69) aus den iPS-Zelllinien derselben Klonnummern generiert wurden. Nach dem Erstautor der Studie, Tim Krohne, werden sie im Folgenden als kRPE bezeichnet. Für kRPE-Zellen konnte dabei bereits demonstriert werden, dass sie ein exzellentes *in vitro*-Modell für RPE-Zellen darstellen (69).

In Hinblick auf eine künftige Co-Kultur der retinalen Organoide mit den bRPE-Zellen wurde im dritten Teil der Arbeit außerdem der Einfluss des Mediums zur Kultivierung der retinalen Organoide auf die bRPE-Zellen untersucht. Ergänzend wurde überprüft, ob die bRPE-Zellen nach abgeschlossener Differenzierung längerfristig in dem ökonomischeren Zellkulturmedium der kRPE-Zellen kultiviert werden können. Dies könnte in zukünftigen Experimenten zu einer Optimierung des Ressourcenverbrauchs beitragen. Außerdem wurde erhoben, ob die Kryokonservierung einen negativen Einfluss auf die Eigenschaften der bRPE-Zellen ausüben könnte.

2. Material

2.1 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete iPS-Zelllinien

Pseudonym	Klon	Organismus	Ursprungsgewebe
MK	26, 27	Homo sapiens	Fibroblasten
NJ	105, 111	Homo sapiens	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
NG	2, 3	Homo sapiens	Fibroblasten

Die Fibroblasten und mononukleären Zellen des peripheren Blutes wurden gesunden Probanden entnommen und entsprechend der Publikationen von Brandl et al. (69,70) mit kleinen Anpassungen nach Nachtigal et al. (71) am Institut für Humangenetik Regensburg zu iPS-Zellen reprogrammiert. Sie standen zu Beginn der Arbeit zur Verfügung. Das Pseudonym und die Klonnummerierung dienen der internen Zuordnung der Zelllinien am Institut für Humangenetik Regensburg.

Die kRPE-Zelllinien wurden entsprechend des Protokolls nach Krohne et al. (68) mit leichten Anpassungen durch Brandl et al. (69) am Institut für Humangenetik Regensburg aus den in Tabelle 1 beschriebenen iPS-Zelllinien derselben Klonnummern differenziert und standen zu Beginn der Arbeit zur Verfügung.

Ebenso wurden die in dieser Arbeit verwendeten bRPE-Zelllinien in einer Vorarbeit (67) aus den in Tabelle 1 beschriebenen iPS-Zelllinien derselben Klonnummern differenziert. Pro Klon standen dabei 2 bis 3 experimentelle Replikate zur Verfügung. Die Nummer des Replikats wird im Folgenden durch einen Unterstrich nach der Klonierungsnummer dargestellt (z.B. MK26_1).

2.2 Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
β-Mercaptoethanol, C ₂ H ₆ OS	AppliChem GmbH, Darmstadt; DE
4', 6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), C ₁₆ H ₁₅ N ₅	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumperoxodisulfat (APS), (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE

Clarity™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Clarity Max™ Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP), Desoxythymidintriphosphat (dTTP))	Genaxxon Biosience, Ulm, DE
Ethanol ≥ 99,8 p.a., C ₂ H ₆ O	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol ≥ 99,8, vergällt, C ₂ H ₆ O	Chemikalienausgabe der Universität Regensburg
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Merck Chemicals GmbH, Schalbach, DE
Milchpulver Blotting grade, fettarm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Methanol; CH ₄ O	Merck Chemicals GmbH, Schalbach, DE
Natriumazid, NaN ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumchlorid, NaCl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; SDS) ≥ 99 %, C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S	AppliChem GmbH, Darmstadt; DE
Odyssey® Blocking Buffer (<i>tris-buffered saline</i> ; TBS)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Paraformaldehyde (PFA) 4 % in Phosphat- gepufferter Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> ; PBS), OH(CH ₂ O) _n (n = 8 – 100)	Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA
Proteasehemmer-Cocktail cOmplete™	Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
RNase AWAY®	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Rotiphorese Gel 40 % Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
ROTI®Quant, 5x konz.	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TWEEN® 20	VWR International Germany GmbH, Darmstadt,

	DE
Wasserstoffperoxid 34,5 – 36,5 %, H ₂ O ₂	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ziegenserum	Abcam plc. Milton, UK

2.3 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper

Primärantikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Hersteller
α-ATP1B1	pAK	Kaninchen	1:100	ICC	Proteintech Group Inc., Chicago, IL, USA
α-BEST1	mAK	Maus	1:500	ICC	Abcam plc. Milton, UK
α-Beta-Actin	mAK	Maus	1:10000	WB	Merck KGaA, Darmstadt, DE
α-OTX2	pAK	Kaninchen	1:250	ICC	Merck KGaA, Darmstadt, DE
α-RHO-1D4	mAK	Maus	1:10000	WB	Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, CA
α-ZO-1	pAK	Kaninchen	1:500	ICC	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

pAK = polyklonaler Antikörper, mAK = monoklonaler Antikörper, WB = Westernblot, ICC = Immunzytochemie

Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung	Verwendung	Hersteller
Goat anti-Mouse IgG H & L chain specific Peroxidase conjugated	1:10000	WB	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor® 488	1:667	ICC	Invitrogen/ Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

conjugated

Goat anti-Mouse IgG 1:667
Alexa Fluor® 594
conjugated

WB = Westernblot, ICC = Immunzytochemie

2.4 Molekularmassenstandard

Tabelle 5: Verwendete Molekularmassenstandards

Molekularmassenstandard	Verwendung	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Molekularmassenstandard für die gelelektrophoretische Auf trennung von Proteinen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.5 Enzyme

Tabelle 6: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
RNAse-Free DNase Set	Qiagen N. V., Hilden, DE

2.6 Kit-Systeme

Tabelle 7: Verwendete Kit-Systeme

Kitsystem	Hersteller
PureLink™ RNA Mini Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taykon Low ROX Probe 2x MasterMix dTTP blue	Kaneka Eurogentec S. A., Seraing, BE

2.7 Oligonukleotide

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Name	5'-3'-Sequenz	Gen
BEST1-H2-F	ACATGGATCCTTATTGGGCC	<i>BEST1</i>
BEST1-H2-R	CTGTGACTGGATCAGTGTC	
BEST1-H2-P	ACCTGCTTCCTAATGGGGATGCTTCGC	

HPRT1-H1-F	CTTGCTTCCTGGTCAGG	<i>HPRT1</i>
HPRT1-H1-R	TCAAATCCAACAAAGTCTGGC	
HPRT1-H1-P	GCTTGCTGGTAAAAGGACCCCACG	
MITF-H3-F	TATGGAAACCAAGGTCTGCC	<i>MITF</i>
MITF-H3-R	CTTCAGACTCTGTGAGCTCC	
MITF-H3-P	CCACCAGGCCTCACCATCAGCAACT	
PMEL-H3-F	CTGGTGAAGAGACAAGTCCC	<i>PMEL</i>
PMEL-H3-R	CAGTCAGCTCAAATGCATCC	
PMEL-H3-P	AAGTGCCGAGATCCTGCAGGCTGT	
RPE65-H2-F	AGAATTAGTCACGCTCCCC	<i>RPE65</i>
RPE65-H2-R	AACTCAAATGCTTGACGAGG	
RPE65-H2-P	GCAGTGACGAGACTATCTGGCTGGAGC	

F = Primer forward, R = Primer reverse, P = probe, Sonde

Alle Oligonukleotide und alle Sonden wurden von Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen.

2.8 Zellkulturmateriale

Tabelle 9: Verwendete Medien und Zusätze

Medien und Zusätze	Hersteller
β-Mercaptoethanol, ≥ 99 %, C ₂ H ₆ OS	Merck KGaA, Darmstadt, DE
all-trans-Retinsäure (<i>all-trans-retinoic acid</i> , ATRA), ≥ 98 %, C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA
(S)-Blebbistatin ≥ 98 %, C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₂	Cayman Chemical; Ann Arbor, MI, USA
B-27® Supplement (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
B-27® Supplement (without Vitamin A) (50x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Corning® Matrigel® Matrix	Corning Inc., Corning, NY, USA
Corning® Matrigel® Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix	Corning Inc., Corning, NY, USA

CryoStor® CS10	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, CA		
Dispase (1 U/ml)	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, CA		
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F-12 (1:1) (1x)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM/F-12 GlutaMAX™	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
DMEM High Glucose Medium (4,5 g/L)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Dulbecco's PBS 1x (DPBS)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamicin (50 mg/ml)	Merck KGaA, Darmstadt, DE		
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ F-12 (1x)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ <i>Fetal Bovine Serum</i> (fetales Kälberserum, FBS), qualifiziert, hitzeinaktiviert, Brasilien	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ GlutaMAX™ Supplement	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ HEPES Buffer Solution (1 M)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
Heparin (20 mg/ml)	Merck KGaA, Darmstadt, DE		
Knochenmorphogenetisches Protein 4 (<i>bone morphogenetic protein 4; BMP-4</i>) (1000x)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
KnockOut™ DMEM	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA
KnockOut™ Serum Replacement (KOSR)	Thermo	Fisher	Scientific, Waltham, MA, USA

L-Glutamine 200 mM (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mycoplasma Off™	Minerva Biolabs GmbH, Berlin, DE
Mycoplasma Removal Agent (MRA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
N2 Supplement (100x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Nicotinamid, ≥ 98 %, C ₆ H ₆ N ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, DE
OptiMEM™ Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Taurine (1000x), C ₂ H ₇ NO ₃ S	Merck KGaA, Darmstadt, DE
TeSR™-E7	STEMMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, CA
TrypLE™ Select (1x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge
ATRA-Stammlösung	ATRA Dimethylsulfoxid	10 mM
Blebbistatin-Stammlösung	(S)-Blebbistatin Dimethylsulfoxid	10 mM
BMP-4-Stammlösung	BMP-4 HCl Humanes Serumalbumin Millipore H ₂ O	1,5 nM 3,8 mM 0,1 % (v/v)
5x Laemmli Puffer	Bromphenolblau Tris-HCL pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS	0,01 % (v/v) 60 mM 5 % (v/v) 2 % (w/v)

	Glycerol	10 % (v/v)
	H ₂ O dest.	
PBS 10x, pH 7,6	NaCl	8 % (w/v)
	KCl	0,2 % (w/v)
	Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	1,44 % (w/v)
	KH ₂ PO ₄	0,24 % (w/v)
	H ₂ O dest	
SDS-Laupuffer, pH 8,6	Tris-HCl	0,25 mM
	Glycine	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
	H ₂ O dest	
Taurin-Puffer	NaCl	5 M
	MgCl ₂	1 M
	Tris-HCl, pH 7,5	1 M
	Taurin	100 mM
	H ₂ O dest.	
TBS, pH 7,5	Tris	50 mM
	NaCl	150 mM
	H ₂ O dest	
TBS-T	TWEEN® 20	0,1 % (v/v)
	1x TBS	
Towbin 10x, pH 8,7	Glycin	1,9 M
	Tris	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	H ₂ O dest	

2.10 Verbrauchsmaterial

Tabelle 11: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
12-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
24-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH,

	Kremsmünster, AT
38,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld, DE
48-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
6-Well Zellkulturplatte CELLSTAR®	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AT
6-Well Zellkulturplatte	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
6-Well Zellkulturplatte	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
8-er Deckelkette, flach (PCR)	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Auffanggefäß 250 ml, steril	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
BD Microlance™ 3 Kanülen, 27G, 0,4 x 19 mm	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Corning Costar® Zellkulturplatte mit ultraniedriger Anhaftung (24 Well)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Corning® Costar® Mikrotiterplatte mit ultraniedriger Anhaftung (96 Well U-bottom)	Corning Inc., Corning, NY, USA
Corning® Zellkulturkolben mit ultraniedriger Anhaftung (25 cm²)	Corning Inc., Corning, NY, USA
CryoPure Gefäß 1,6 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Deckgläschchen 12/13 mm Ø	VWR International, Radnor, PA, USA
Ep Dualfilter T.I.P.S.®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Gel-Blotting-Papiere 1,5 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Handschuhe Nitril blau	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
Handschuhe Nitril grün	Kimberly-Clark Professional, Roswell, GA, USA
Immersionsöl IMMOIL-F30CC	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
Küvetten, 1 ml – 2,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
MicroAmp™ optische 384-Well-Reaktionsplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE

Mikroreaktionsgefäß 2,0 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Objektträger SuperFrost® Plus	VWR International, Radnor, PA, USA
Parafilm M	Bemis Company, Neenah, WI, USA
Pasteurpipetten Glas 150 mm	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
PCR-Mikroreaktionsgefäße 0,2 ml Kette	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Petrischalen (10 cm)	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Pipettenspitzen 10/100/1000 µl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
Pipettenspitzen mit Filter, steril 0,1 – 20 µl	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht, DE
Pipettenspitzen mit Filter, steril 10 µl/100 µl	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen (Luhe), DE
Pipettenspitzen mit Filter, steril 1250 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
QIAshredder® Säulen	Qiagen N. V., Hilden, DE
Reagenzreservoirs steril	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
Reaktionsgefäß 5,0 ml	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
Skalpell FEATHER® No. 22	FEATHER® Safety Razor Co., Osaka, JP
Spritze 1 ml BD Plastipak™	Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Sterile serologische Pipetten 10/25/50 ml	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
Sterile serologische Pipette 5 ml PYREX®	Corning Inc., Corning, NY, USA
Thermo Scientific™ ClipTip™ Pipettenspitzen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ThinCert® Zellkultureinsatz für 6 Well Platten, Porendurchmesser 0,4 µm	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
ThinCert® Zellkultureinsatz für 12 Well Platten, Porendurchmesser 0,4 µm	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
Transfermembran Immobilon®-P, Porengröße 0,45 µm	Merck KGaA, Darmstadt, DE

Vakuumfilter Steriflip-GP, 50 ml	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Vakuumfilter 150 ml	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Vakuumfilter 250 ml/500 ml	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Wägeschälchen 44 x 44 mm	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
Zellschaber 20 mm	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, DE
Zellschaber M 20 mm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Zellsieb EASYstrainer™ 40 µm steril	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
Zellsieb pluriStrainer® Mini 100 µm steril	pluriSelect Life Science, Leipzig, DE
Zentrifugenröhrchen, Falcon®, 15 ml	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT
Zentrifugenröhrchen, Falcon®, 50 ml	Greiner Bio-One International GmbH Kremsmünster, AT

2.11 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
-20 °C Gefrierschrank	Liebherr AG, Bulle, CH
-80 °C Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Accu-Jet Pipettiergerät	Brand, Wertheim, DE
Analysewaage Explorer 2	OHAUS, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA
Belly Dancer® Orbital Shaker	IBI Scientific, Dubuque, IA, USA
CO ₂ -Inkubator 37 °C	BINDER GmbH, Tuttlingen, DE
E1-ClipTip™ Equalizer Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einkanalpipette Research 10 µl/100 µl/1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Eismaschine AF 100S	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
Eppendorf pipette Research® plus, 8-Kanal, 30 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE

Gelelektrophoresekammer Mini PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Glasplatte Mini PROTEAN®	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Mainz, DE
Laborabzug 165/93 mm	Wesemann International GmbH, Wangen im Allgäu, DE
Leica DM IL Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Leica S6D Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank	Scanlaf/LaboGene, Allerød, DK
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Minizentrifuge MyFuge™	Benchmark Scientific Inc., Sayreville, NJ, DE
Minizentrifuge Sprout™	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Netzgerät BluePower™ 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Nikon Eclipse TS100 Mikroskop	Nikon Europe BV, Amsterdam, NE
Nikon Eclipse TS2 Mikroskop	Nikon Europe BV, Amsterdam, NE
Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Olympus Fluoview FV3000	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
QuantStudio® 5 Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Samsung Galaxy S7	Samsung AG, Seoul, KR
Schüttler Titramax 101	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach, DE
Spacerplatten Mini Protean® 1,5 mm	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Spannungsmessgerät EVOM™	World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA
Spektrometer Ultraspec 2100 pro	GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
SW 40 Ti Ausschwingrotor	Beckman Coulter, Krefeld, DE
Thermocycler TProfessional	Biometra GmbH, Göttingen, DE

Thermomixer compact Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Transferpette® 10/100/1000 µl	Brand, Wertheim, DE
Ultraschallbad SONOREX SUPER 10 P	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, DE
Ultraschallgerät Vibra-Cell™ VCX400	Sonics & Materials Inc. Newtown; CT, USA
UV-Licht, freistehend	Bioquell, Andover, UK
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, DE
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortex Microspin FV-2400	Biosan, Riga, LV
Waage Adventurer	OHAUS, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, DE
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

2.12 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

Software	Hersteller
CorelDRAW 2021	Corel Corporation, Ottawa, CA
FV31S-SW Viewer software (Ver. 2.5)	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, DE
IBM SPSS Statistics 25	International Business Machines Corp., Armonk, NY, USA
ImageJ 1.53d	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Image Studio (Ver. 5.2)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Microsoft Office	Microsoft Cooperation, Redmond, WA USA
QuantStudio™ Design & Analysis Software	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3. Methoden

3.1 Differenzierung der iPS-Zellen zu retinalen Organoiden und bRPE-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von den iPS-Zellklonen MK27, NJ105 und NJ111 je 1 Differenzierung und ausgehend von dem iPS-Zellklon NG2 2 Differenzierungen eingeleitet. Die Methode zur Differenzierung der iPS-Zellen zu retinalen Organoiden basiert auf dem Protokoll von Zhong et al. (47) mit Anpassungen nach Capowski et al. (51,72). Die zusätzliche Generierung von bRPE-Zellen als Nebenprodukt des Differenzierungsprotokolls für retinale Organoide wurde am Institut für Humangenetik Regensburg nach Berber et al. (66) etabliert.

3.1.1 Differenzierungsprotokoll

Vor dem Tag der Einleitung der neuronalen Differenzierung wurden drei 70 bis 80 % konfluente Wells einer 6-Well-Platte mit iPS-Zellen in Suspensionskultur überführt. Dazu wurden die iPS-Zellen nach Entfernung der zuvor markierten, ausdifferenzierten Zellkolonien 2-mal mit DPBS gewaschen und für 15 Minuten bei 37 °C mit Dispase (1 ml/Well) inkubiert. Nach erneutem 2-maligen Waschen mit DPBS wurden die Zellen mit 2 ml TeSR™ pro Well unter Zusatz von Blebbistatin (10 µM) vom Boden gelöst und die Zellsuspension aller Wells in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt. Das Röhrchen wurde auf ein Endvolumen von 10 ml mit TeSR™ unter Zusatz von Blebbistatin (10 µM) aufgefüllt und die Zellsuspension in einen Zellkulturkolben mit ultraniedriger Anhaftung (25 mm²) überführt. Über 3 Medienwechsel wurden die Zellaggregate an das neuronale Induktionsmedium (NIM) gewöhnt (s. Tabelle 14). So wurden die Zellaggregate und das Medium am Tag 1 der Differenzierung in ein 50 ml-Zentrifugenrörchen überführt. Nach 3-minütiger Zentrifugation der Zellsuspension bei 800 rpm wurde der Überstand bis auf einen Rest von circa 1,5 ml abgesaugt. Anschließend wurde das Zentrifugenrörchen mit TeSR™ und NIM im Verhältnis 3:1 auf 10 ml aufgefüllt und die Zellaggregate inklusive Medium wurden wieder in den Zellkulturkolben überführt. Der eben beschriebene Medienwechsel wurde mit einem steigenden Anteil an NIM am 2. (1:1) und 3. Tag (100 % NIM) der Differenzierung wiederholt.

Tabelle 14: Zusammensetzung NIM

Zusatz zu DMEM High Glucose Medium (4,5 g/L) /Gibco™ F-12 (1x) (1:1)	Menge
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	1 % (v/v)
Gibco™ GlutaMAX™ Supplement	1 % (v/v)
N2 Supplement (100x)	1 % (v/v)
Heparin (20 mg/ml)	0,2 % (w/v)

Am 6. Tag der Differenzierung wurden die Zellaggregate in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und nach Absaugen des Mediums mit 10 ml frischem NIM und BMP-4 (1,5 nM) wieder in den Zellkulturkolben überführt. Am 7. Tag der Differenzierung wurden je 30 µl der Zellaggregate mit 3 ml des Mediums auf 3 Wells einer mit Matrigel-GFR-beschichteten 6-Well-Zellkulturplatte transferiert. Daraufhin wurde an jedem 3. Tag die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt (Tag 9, Tag 12 und Tag 15 der Differenzierung). Am 16. Tag der Differenzierung wurde das alte Medium komplett abgesaugt und durch 5 ml retinales Differenzierungsmedium (RDM) pro Well ersetzt (s. Tabelle 15). Der eben beschriebene Medienwechsel wurde am 18. und 20. Tag der Differenzierung wiederholt (**Abbildung 4 A**).

Tabelle 15: Zusammensetzung RDM

Zusatz zu DMEM High Glucose Medium (4,5 g/l) / Gibco™ F-12 (1x) (3:1)	Menge
B-27® Supplement (without Vitamin A) (50x)	2 % (v/v)
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	1 % (v/v)
Gibco™ GlutaMAX™ Supplement	1 % (v/v)
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	1 % (v/v)

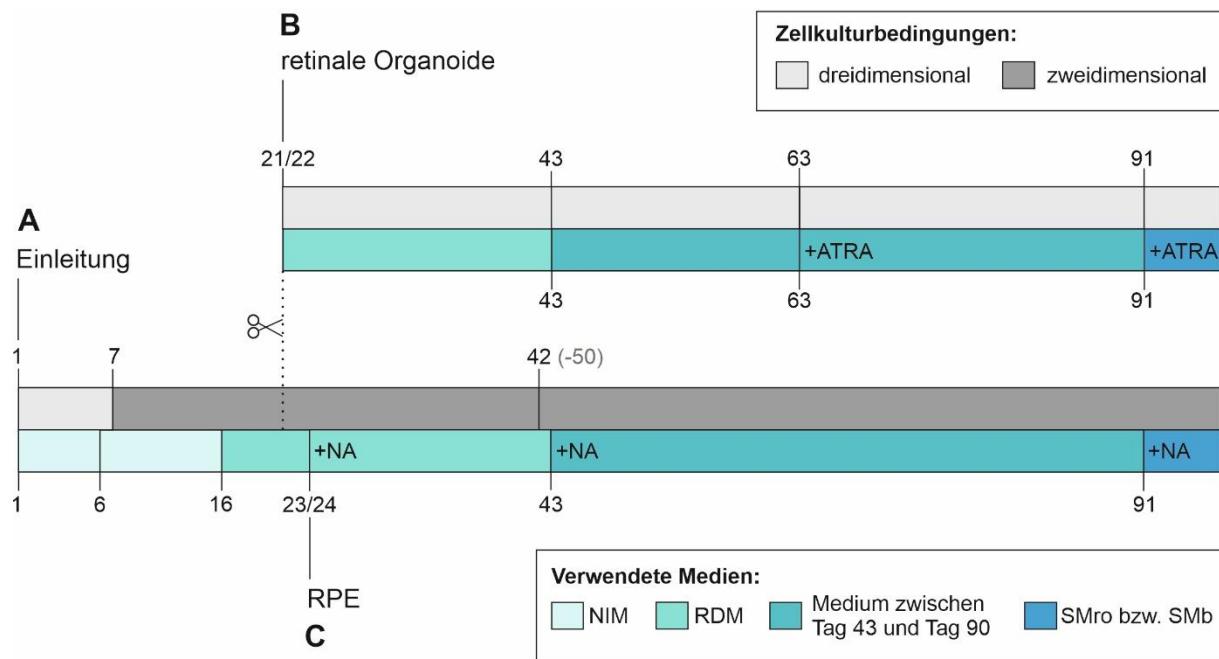


Abbildung 4: Schematische Übersicht zur Differenzierung der iPS-Zellen zu retinalen Organoiden und bRPE-Zellen

(A) Nach Überführung der iPS-Zellen in Suspensionskultur am Tag 0 wurde am Tag 1 die neuronale Differenzierung mit neuronalem Induktionsmedium (NIM) eingeleitet. Am Tag 6 erfolgte die Zugabe von BMP-4 (1,5 nM). Am 7. Tag wurden die Zellen auf 6-Well-Zellkulturplatten transferiert. Am 16. Tag wurde das Medium auf retinales Differenzierungsmedium (RDM) umgestellt. (B) Am 21. bzw. 22. Tag wurden die sich entwickelnden neuronalen Domänen aus den 6-Well-Zellkulturplatten ausgeschnitten und auf 96-Well-Zellkulturplatten mit ultra-niedriger Anhaftung transferiert. Am Tag 43 wurden retinale Organoide von guter Qualität (schießscheibenförmig mit einem breiten, hellen Außenrand) auf eine 24-Well-Platte mit ultra-niedriger Anhaftung überführt und im Orbital Shaker kultiviert. Sie erhielten ab diesem Zeitpunkt ein Medium in veränderter Zusammensetzung. Am 63. Tag wurden die Organoide erneut hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt. Dem Medium wurde ab sofort an 5 Tagen pro Woche all-trans-retinoic acid (all-trans-Retinsäure, ATRA) (Endkonzentration: 1 µM) zugesetzt. Am 91. Tag wurden retinale Organoide von unzureichender Qualität nochmals aussortiert und das Medium auf das Standardmedium für retinale Organoide (SMro) umgestellt. Der Zusatz von ATRA erfolgte 2-mal pro Woche (Endkonzentration: 0,5 µM). (C) Ab dem 23. bzw. 24. Tag wurde den auf den 6-Well-Zellkulturplatten verbleibenden Zellen 10 mM Nicotinamid (NA) zum Medium hinzugefügt. Zwischen dem 42. bis zum 50. Tag wurden die pigmentierten Areale ausgeschnitten und auf neue 6-Well-Zellkulturplatten transferiert. Am 43. Tag wurde das Medium analog zu den retinalen Organoiden umgestellt, wobei 10 mM NA hinzugefügt wurden. Am 91. Tag wurde das Medium auf das Standardmedium für bRPE-Zellen (SMb) mit 10 mM NA umgestellt.

Am 21. oder 22. Tag der Differenzierung wurden die sich entwickelnden neuronalen Domänen mit 2 1 ml-Spritzen mit 27G-Kanülen unter einem Nikon Eclipse TS2 Mikroskop (4-fache Vergrößerung) ausgeschnitten. Vor und nach dem Ausschneiden wurde das Medium gewechselt (5 ml RDM/ Well), wobei vor dem Ausschneiden Hepes zugesetzt wurde (50 µl/ Well). Mit je 250 µl RDM wurden die neuronalen Domänen anschließend auf eine 96-Well-Zellkulturplatte mit ultra-niedriger

Anhaftung transferiert. Falls sich nach dem ersten Ausschneiden noch weitere neuronale Domänen auf den Zellkulturplatten befanden, wurden die Arbeitsschritte nach 48 Stunden nochmals wiederholt. Im Gegensatz zu dem üblichen Vorgehen bei der Differenzierung von retinalen Organoiden, wurden die 6-Well-Zellkulturplatten nach dem letzten Ausschneiden nicht verworfen, sondern die verbliebenen Zellen wurden nach der unter Punkt 3.1.3 beschriebenen Methode zu bRPE-Zellen ausdifferenziert.

3.1.2 Weitere Differenzierung der retinalen Organoide

Bis inklusive dem 42. Tag der Differenzierung wurde das Medium der retinalen Organoide 2-mal pro Woche zur Hälfte gewechselt (125 µl/Well). Am 43. Tag der Differenzierung wurden die Organoide hinsichtlich ihrer Qualität beurteilt. Unter dem Mikroskop ist die sich entwickelnde neuronale Retina als heller Außenrand des retinalen Organoides zu erkennen. Schießscheibenförmige Organoide mit einem breiten, hellen Außenrand wurden auf eine 24-Well-Platte mit ultra-niedriger Anhaftung überführt. Organoide, die diese Qualitätsmerkmale nicht aufwiesen, wurden aussortiert. Bei dem anschließenden Medienwechsel wurde ein neues Zellkulturmedium mit veränderter Zusammensetzung verwendet (500 µl/Well; s. Tabelle 16). Ab diesem Zeitpunkt wurden die retinalen Organoide auf dem Orbital Shaker kultiviert.

Tabelle 16: Zellkulturmedium der retinalen Organoide bzw. bRPE-Zellen vom 43. bis 90. Tag der Differenzierung

Zusatz zu DMEM High Glucose Medium (4,5 g/l): Gibco™ F-12 (1x) (3:1)	Menge
Gibco™ FBS, qualifiziert, hitzeinaktiviert, Brasilien	10 % (v/v)
B-27® Supplement (50x)	2 % (v/v)
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	1 % (v/v)
Gibco™ GlutaMAX™ Supplement	1 % (v/v)
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	1 % (v/v)
Taurine (1000x)	100 µM

Am 63. Tag der Differenzierung wurden die retinalen Organoide, die keine der oben genannten Qualitätsmerkmale aufwiesen, erneut aussortiert. Zwischen Tag 63 und

Tag 90 der Differenzierung wurde dem Zellkulturmedium an 5 Tagen pro Woche all-trans-retinoic acid (all-*trans*-Retinsäure, ATRA) in einer Endkonzentration von 1 µM frisch zugesetzt. An 2 Tagen pro Woche wurde es vollständig gewechselt. Am 91. Tag der Differenzierung wurde die Qualität der retinalen Organoide nach den oben genannten Kriterien nochmals bewertet und das Medium zum letzten Mal umgestellt (s. Tabelle 17Tabelle 18). Es wird im Folgenden als Standardmedium für retinale Organoide (SMro) bezeichnet (**Abbildung 4 B**).

Tabelle 17: Zusammensetzung SMro bzw. SMb (Zellkulturmedium der retinalen Organoide bzw. der bRPE-Zellen ab Tag 91 der Differenzierung)

Zusatz zu DMEM/F-12 GlutaMAX™	Menge
Gibco™ FBS, qualifiziert, hitzeinaktiviert, Brasilien	10 % (v/v)
N2 Supplement (100x)	1 % (v/v)
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	1 % (v/v)
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100x)	1 % (v/v)
Taurine (1000x)	0,1 % (v/v)

SMro: Zusatz von 0,5 µM ATRA, SMb: Zusatz von 10 mM Nicotinamid

Das Medium wurde ab diesem Zeitpunkt nur noch 2-mal pro Woche vollständig gewechselt (750 µl/Well), wobei ATRA in einer Konzentration von 0,5 µM jeweils frisch hinzugefügt wurde. Jeweils am Tag 91 oder Tag 93 der Differenzierung wurden lichtmikroskopische Aufnahmen aller retinalen Organoide mit einem Smartphone Samsung Galaxy S7 an einem Nikon Eclipse TS2 oder TS100 Mikroskop erstellt.

3.1.3 Weitere Differenzierung der bRPE-Zellen

Am Tag des 2. Ausschneidens der neuronalen Domänen (Tag 23 oder 24 der Differenzierung) wurde RDM 10 mM Nicotinamid zugesetzt. Abwechselnd erhielten entweder 1 oder 2 der 3 Wells ab sofort das so veränderte Zellkulturmedium bis zum 42. Tag der Differenzierung 3-mal wöchentlich (3 ml/Well). Ab dem 43. Tag der Differenzierung wurde das Medium analog zu dem der retinalen Organoide umgestellt, wobei bei dem/den entsprechenden Well/Wells wiederum eine Zugabe von 10 mM Nicotinamid erfolgte (s. Tabelle 16). Zwischen dem 42. und 50. Tag der Differenzierung wurden die pigmentierten Areale jedes Wells mit 2 1 ml-Spritzen mit

27G-Kanülen unter einem Leica S6 D Mikroskop mit Kaltlichtquelle ausgeschnitten und jeweils in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt. Nach 5-minütigem Zentrifugieren bei 1200 rpm wurde der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 1 ml TrypLE™ Select (1x) gelöst und 15 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nochmals bei 1200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml des Zellkulturmediums gelöst. Schließlich wurde die Zellsuspension auf eine mit Matrigel-GFR-beschichtete 6-Well-Zellkulturplatte überführt, auf der bereits Zellkulturmedium vorgelegt wurde (2 ml/Well). Ab dem 91. Tag der Differenzierung erhielten die RPE-Zellen ebenfalls analog zu den retinalen Organoiden ein neues Medium (s. Tabelle 17). Statt 0,5 µM ATRA wurde diesem bei den entsprechenden Wells 10 mM Nicotinamid zugefügt. Im Folgenden wird es als Standardmedium für bRPE-Zellen bezeichnet (SMb) (**Abbildung 4 C**). Zeigte sich bei der Statusüberprüfung der Zellen eine dichte, hexagonale Kopfsteinpflastermorphologie, wurden die Zellen passagiert oder in Flüssigstickstoff konserviert. Zur Zellpassage wurden die bRPE-Zellen mit steril filtriertem DPBS gewaschen (2 ml/Well) und für 25 bis 35 Minuten mit TrypLE™ Select bei 37 °C inkubiert (1 ml/Well). Anschließend wurde jedem Well nochmals 1 ml DPBS zugegeben und die Zellen wurden durch das Spülen mit einer Pipette vom Boden des Wells abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Zentrifugenrörchen überführt und für 4 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in dem entsprechenden Medium gelöst und die Zellsuspension mit einem Teilungsverhältnis von 1:6 auf mit Matrigel-GFR-beschichtete 6-Well-Zellkulturplatten aufgeteilt. Am Tag 138 der Differenzierung wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der bRPE-Differenzierung NJ111 mit einem Smartphone Samsung Galaxy S7 an einem Nikon Eclipse TS100 Mikroskop erstellt.

3.1.4 Konservierung der bRPE-Zellen

Die Methode zur Konservierung der bRPE-Zellen in Flüssigstickstoff entsprach der unter Punkt 3.1.3 beschriebenen Zellpassage. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml CryoStor™ gelöst und die Zellsuspension in ein CryoPure Gefäß überführt. Vor der endgültigen Lagerung der Zellen im Flüssigstickstofftank wurden diese für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert.

3.2 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien wurden bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % inkubiert. Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sterilbank mit sterilen Medien, Zusätzen und Materialien. Alle verwendeten Zellkulturmedien wurden bei 4 °C gelagert und höchstens 14 Tage lang verwendet. Etwa 1 Stunde vor dem Medienwechsel wurden die Medien im Dunkeln auf Raumtemperatur erwärmt. Alle verwendeten, nach Angaben des Herstellers mit Matrikel- oder Matrikel-GFR-beschichteten Zellkulturplatten wurden mit DMEM-F12 oder KnockOut™ DMEM bedeckt und mit Parafilm verschlossen höchstens eine Woche bei 4 °C aufbewahrt. Mindestens 30 Minuten vor Verwendung der Zellkulturplatten wurden diese bei 37 °C gelagert.

3.2.1 Kultivierung der iPS-Zellen und Sicherung von Zellpellets zur Isolation der RNA

Die iPS-Zellen wurden auf Matrikel-beschichtete 6-Well-Zellkulturplatten mit TeSR™ (2 ml/Well) unter Zugabe von Gentamicin (25 µg/ml) kultiviert. Nach dem Auftauen der in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen wurden diese täglich unter dem Mikroskop beurteilt. Ausdifferenzierte Zellkolonien wurden mit einem Stempel markiert und anschließend während des täglichen Medienwechsels mit der Pasteurpipette unter Unterdruck abgesaugt. Die iPS-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % zur Zellpassage oder zur Sicherung von RNA-Proben 5 Minuten bei 37 °C mit Dispase (1 ml/Well) inkubiert. Nach Entfernen der Dispase wurden die Zellen 2-mal mit DMEM-F12 (2 ml/Well) gewaschen. Dann wurden die zuvor markierten, ausdifferenzierten Kolonien während eines dritten Waschschrittes abgesaugt. Die verbliebenen iPS-Kolonien wurden zur Zellpassage mit Hilfe einer Glaspipette unter konstanter Abgabe von Medium (1 ml/Well) fragmentiert und durch einen Zellschaber vom Boden des Wells abgelöst. Nach mehrfachem, vorsichtigem Resuspendieren der Zellkoloniefragmente wurde die Zellsuspension auf 6-Well-Platten aufgeteilt (je 1 ml Zellsuspension/Well). Dabei wurde zuvor 1 ml frisches Medium in jedes Well transferiert.

Zur Sicherung von RNA-Proben wurden die iPS-Zellen nach Entfernung der ausdifferenzierten Kolonien unter Zugabe von 1 ml DPBS mit einem Zellschaber vom

Boden der Zellkulturplatte gelöst und in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Mit 500 µl DPBS wurden eventuell verbliebene Zellen ebenfalls in das Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zentrifugation der Zellsuspension für 5 Minuten bei 1200 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Das weitere Vorgehen ist unter Punkt 3.7.1. beschrieben.

3.2.2 Konservierung der iPS-Zellen

Die Konservierung der iPS-Zellen in Flüssigstickstoff entsprach im Wesentlichen den Arbeitsschritten der Zellpassage, außer dass die Zellen auch vor der Inkubation mit 1 ml Dispase 1-mal mit DMEM-F12 gewaschen wurden (2 ml/Well). Nach der Entfernung der ausdifferenzierten Zellkolonien wurden die Zellen unter Zugabe von DMEM-F12 (2 ml/Well) mit einem Zellschaber vom Boden des Wells abgelöst und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml CryoStor® resuspendiert und in ein CryoPure-Gefäß transferiert. Vor der endgültigen Lagerung der Zellsuspension im Flüssigstickstofftank wurde diese für mindestens 24 Stunden bei -80 °C aufbewahrt.

Um die Zellen erneut in Kultur zu nehmen, wurden sie sofort nach der Entnahme aus dem Flüssigstickstofftank in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in einem 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit TeSR™ (5 ml) und Gentamicin (25 µg/ml) 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in TeSR™ (1 ml) unter Zugabe von Gentamicin (25 µg/ml) gelöst und in 1 Well einer 6-Well-Zellkulturplatte transferiert. Dem Medium der iPS-Zelllinien, die noch nicht gegen Mykoplasmen behandelt wurden oder deren Behandlung schon länger zurück lag, wurde 7 Tage lang Mycoplasma Removal Agent (MRA) zugefügt (10 µl/ml).

3.2.3 Kultivierung der kryokonservierten RPE-Zellen

Nach dem Auftauen wurden sowohl die bRPE- als auch die kRPE-Zellen auf Matrigel-GFR-beschichteten 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert. Die Konfluenz und Morphologie der Zellen wurde regelmäßig während des Medienwechsels unter dem Mikroskop beurteilt. Das Medium, das zur Kultivierung der kRPE-Zellen verwendet wurde, wird regelmäßig in vergleichbarer Zusammensetzung bei aus iPS-Zellen

differenzierten RPE-Zellen eingesetzt (69,73–75). Es besteht aus KnockOut™ DMEM mit Zusätzen (s. Tabelle 18) und wird in Folgendem als Standardmedium für kRPE-Zellen (SMk) bezeichnet. Das Medium wurde 3-mal pro Woche gewechselt.

Tabelle 18: Zusammensetzung SMk

Zusatz zu KnockOut™ DMEM	Menge
KOSR	5 % (v/v)
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	1 % (v/v)
L-Glutamine 200 mM	2 mM
Gentamicin (50 mg/ml)	25 µg/ml
β-Mercaptoethanol	0,1 mM
Nicotinamid, ≥98 %	10 mM

Alle bRPE-Zelllinien wurden in SMb kultiviert (s. Tabelle 17). Es wurde 2-mal pro Woche gewechselt. Nach 12 Tagen wurde die Hälfte der bRPE-Zellen jeder Differenzierung auf SMk umgestellt. Dazu wurde SMb über drei Medienwechsel mit SMk in steigender Konzentration gemischt (3:1, 1:1, 1:3). Nach kompletter Umstellung wurde die Frequenz des Medienwechsels auf 3-mal pro Woche erhöht. Nach 21 Tagen erreichten die RPE-Zellen Konfluenz und wurden auf Matrikel-GFR-beschichtete 6-Well-Transwell-Filter und auf 12-Well-Transwell-Filter passagiert. Die Transwell-Filter wurden zur Vermeidung von Kontaminationen vor der Beschichtung mit Matrikel-GFR 1 Stunde mit UV-Licht bestrahlt. Die Arbeitsschritte zur Zellpassage entsprachen im Wesentlichen der unter Punkt 3.1.3. beschriebenen Zellpassage der differenzierten bRPE-Zellen. Aufgrund der kleineren Wellfläche wurde lediglich die Menge der verwendeten Medien und Zusätze halbiert und die Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben (pluriStrainer® Mini 100 µm steril). Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Teilungsverhältnis von 1:3 auf 6-Well- und 12-Well-Transwell-Zellkulturplatten aufgeteilt.

Nach 2 Wochen wurde das Medium zur Kultivierung der bRPE-Zellen erneut über mehrere Medienwechsel hinweg auf SMro umgestellt (s. Tabelle 17). Diese Umstellung erfolgte für alle bRPE-Zellen, die auf den 6-Well-Transwell-Filtern kultiviert wurden und für die Hälfte der Zellen auf den 12-Well-Transwell-Filtern.

Analog zur Umstellung der bRPE-Zellen auf SMk wurde SMb in einer steigenden Konzentration mit SMro zuerst im Verhältnis 3:1, dann 1:1 und schließlich 1:3 gemischt. Nach 10 Tagen war die Umstellung abgeschlossen und das Medium wurde bei diesen Zellen jetzt 2-mal pro Woche gewechselt. Insgesamt wurden die Zellen 6 Wochen auf den Transwell-Filtern kultiviert.

3.3 Immunzytochemischer Nachweis von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1

Zum immunzytochemischen Nachweis von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1 wurden die RPE-Zellen 6 Wochen auf Transwell-Filtern kultiviert. Die kultivierten, zuvor kryokonservierten RPE-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen ZO-1 gefärbt. Außerdem standen bRPE-Zellen zur Verfügung, die nach ihrer Passage auf Transwell-Filter (entspricht Passage 3) entweder weiterhin in SMb kultiviert wurden oder nach der unter Punkt 3.2.3 beschriebenen Methode 3,5 Wochen vor der Ernte auf SMro umgestellt wurden. Diese wurden ohne zwischenzeitliche Konservierung in Flüssigstickstoff geerntet und mit Antikörpern gegen BEST1, ZO-1, ATP1B1 und OTX2 inkubiert. Als Kontrolle wurde je ein Replikat bei sonst identischer Behandlung nicht in der Primärantikörper-Lösung inkubiert.

Je 1/12 eines 12-Well-Transwell-Filters wurde in eine 48-Well-Zellkulturplatte überführt und mit 1x PBS gewaschen (225 µl/Well). Nach Entfernung des 1x PBS wurden die Zellen für 10 Minuten in PFA (4 %) fixiert und anschließend 3-mal mit 1x PBS mit einem jeweiligen Abstand von 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden je 225 µl Blocklösung (s. Tabelle 19) für 25 Minuten zu den Filtern gegeben. Die Blocklösung wurde entfernt und die Zellen über Nacht mit den Primärantikörper-Lösungen (s. Tabelle 19) bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Filter nach Entfernung der Primärantikörper-Lösung erneut 3-mal mit 1x PBS gewaschen und dann in der Sekundärantikörper-Lösung (s. Tabelle 19) für 2 bis 3 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem 3-maligem Waschen mit 1x PBS wurden die Filterstücke mit Dako Fluorescence Mounting Medium auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach dem vollständigen Abrocknen der Präparate wurden diese mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Olympus Fluoview FV3000) und die Aufnahmen mit den Softwares ImageJ 1.53d und CorelDRAW 2021 bearbeitet.

Tabelle 19: Zusammensetzung der für die ICC verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
Blocklösung	Ziegenserum	10 % (v/v)
	TritonX-100	0,3 % (v/v)
	10x PBS	10 % (v/v)
	H ₂ O dest.	
Primärantikörper-Lösung	Primärer Antikörper	Konzentration s. Tabelle 3
	Ziegenserum	2,5 % (v/v)
	TritonX-100	0,1 % (v/v)
	Natriumazid	0,02 % (v/v)
	10x PBS	10 % (v/v)
	H ₂ O dest.	
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärer Antikörper	Konzentration s. Tabelle 4
	DAPI	0,04 mg/ml (w/v)
	Ziegenserum	2,5 % (v/v)
	TritonX-100	0,1 % (v/v)
	10x PBS	10 % (v/v)
	H ₂ O dest.	

3.4 Messung des TEER

Die Messung des TEER wurde 6 Wochen lang 1-mal wöchentlich an den kryokonservierten bRPE- und kRPE-Zellen durchgeführt, nachdem diese auf 12-Well-Transwell-Filter passagiert wurden. Ab der 4. Woche wurden zusätzlich Messwerte für die nun vollständig auf SMro umgestellten bRPE-Zellen erhoben. Die Messung erfolgte mit dem Spannungsmessgerät EVOM™. Nach Desinfektion des Gerätes mit 70 % Ethanol wurde dieses unter der Sterilbank platziert. Die Spannungselektroden wurden für 15 Minuten in 70 % Ethanol sterilisiert und für 15 Minuten in 150 mM NaCl equilibriert. Zur Erfassung der Messwerte wurde die längere Elektrode auf dem Boden des Wells und die kürzere im Zellkulturmedium oberhalb des Transwell-Filters positioniert. Die erfassten Messwerte eines Transwell-Filters ohne Zellen, der zuvor ebenfalls mit Matrigel-GFR beschichtet wurde, dienten als Referenz und wurden von den gemittelten Duplikaten der TEER-Messwerte

subtrahiert. Schließlich wurde das Ergebnis mit der Filterfläche multipliziert (Einheit: $\Omega \cdot \text{cm}^2$).

3.5 Isolierung und Phagozytose von porzinen POS

3.5.1 Isolierung von porzinen POS und Bestimmung der Konzentration

Die Isolierung der POS durch Dichtegradienten-Zentrifugation und die anschließende Konzentrationsbestimmung via Bradford-Test erfolgte nach dem Protokoll von Brandl et al. (69). Zusammengefasst wurden die auf Eis aufgetauten Retinae durch eine sterile Komresse filtriert und anschließend mit dem Proteasehemmer-Cocktail cComplete™ und 20 % Saccharose in Taurin-Puffer (s. Tabelle 10) unter Verwendung von 5 ml- und 1000 μl -Pipetten weiter homogenisiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 500 g bei einer Temperatur von 4 °C wurde der Überstand erneut in dem Proteasehemmer-Cocktail cComplete™ und 20 % Saccharose in Taurin-Puffer homogenisiert. Mittels Dichtegradienten-Zentrifugation bei 100.000 g für 2 Stunden bei 4 °C in einem SW 40 Ti Ausschwingrotor wurde der homogenisierte Überstand ohne Verwendung der Bremsfunktion aufgetrennt. Anschließend wurde die Fraktion, die POS enthält und sich ringförmig rosafarben präsentiert, abgenommen und in 2 ml-Mikroreaktionsgefäße aliquotiert. Während 3 Waschschritten mit OptiMEM™ Medium wurden die Proben bei 12.000 rpm für je 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Pellets resuspendiert und nach und nach zusammengeführt wurden. Die Konzentration der zuvor aufgereinigten POS wurde mit Hilfe des Bradford-Tests photometrisch bestimmt. Als Referenzprotein diente bovines Serumalbumin (BSA). Zur Erstellung einer Stammlösung mit einer BSA-Konzentration von 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde in Millipore H₂O gelöstes BSA mit bekannter Konzentration (100 mg/ml) mit OptiMEM™ verdünnt. Um ausgehend von dieser Stammlösung eine Kalibrierungskurve erstellen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe mit aufsteigender Konzentration des Referenzproteins gelöst in OptiMEM™ von 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 31,12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 62,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erstellt. Das Bradford-Reagenz ROTI®Quant wurde 1:5 mit Millipore H₂O verdünnt. Anschließend wurden zu 995 μl ROTI®Quant in 1 ml-Küvetten je 5 μl der Referenzproteinlösungen oder der POS-Probe pipettiert. Die so entstandenen Reaktionslösungen wurden gevortext und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Absorbanz der Proben bei 595 nm photometrisch bestimmt.

Als Blindwert diente die gemessene Absorbanz für die Probe ohne BSA (0 µg/ml). Aus den erhaltenen Werten für die Referenzproteinlösungen wurde eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die POS-Konzentration ermittelt werden konnte. Bis zur weiteren Verwendung wurden die aufgereinigten POS bei -80 °C in OptiMEM™ mit 1 % Gibco™ Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) gelagert.

3.5.2 POS-Phagozytose

Die kryokonservierten bRPE- und kRPE-Zellen, die auf 6-Well-Transwell-Filter passagiert wurden, wurden nach 6 Wochen auf den Transwell-Filtern mit je 20 porzinen POS pro Zelle inkubiert. Vor der Inkubation der Zellen wurden die POS auf Eis aufgetaut, in OptiMEM™ gelöst und in einem Ultraschall-Wasserbad mit einer Frequenz von 10 % 5 Minuten lang sonifiziert. Anschließend wurden die POS in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit aufgesetztem Zellsieb einer Porengröße von 40 µm überführt und mit OptiMEM™ auf das benötigte Endvolumen verdünnt. Nach 2 Stunden Inkubation der Zellen bei 37 °C wurden die POS abgesaugt und die RPE-Zellen 3-mal mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden aus der Hälfte der Zellen Proteinproben gewonnen (s. Punkt 3.6.1). Die verbliebenen Zellen wurden weitere 4 Stunden mit 1 ml OptiMEM™ bei 37 °C inkubiert, bevor aus ihnen nach erneutem 2-maligen Waschen mit DPBS ebenfalls Proteinproben gewonnen wurden.

3.6 Nachweis über die Phagozytose von porzinen POS

3.6.1 Gewinnung von Proteinproben

Um Proteinproben aus den mit porzinen POS inkubierten bRPE- oder kRPE-Zellen zu gewinnen, wurden diese mit einem Zellschaber von dem Transwell-Filter gelöst. Zuvor wurde eine Tablette des Proteasehemmer-Cocktails cOmplete™ in 2 ml DPBS gelöst, im Verhältnis 1:25 mit DPBS verdünnt und je 500 µl dieser Roche-cOmplete™-PBS-Lösung (RC-PBS) auf den zu erntenden Transwell-Filter pipettiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein auf Eis gekühltes 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt. Jeder Filter wurde zusätzlich noch 2-mal mit 250 µl der Protease-Inhibitor-Lösung gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation der Proben bei 4 °C und 4.600 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl RC-PBS-Lösung resuspendiert. Mit Hilfe des Ultraschallgeräts Vibra-Cell™

VCX400 wurden die Proben 10 Sekunden mit einer Amplitude von 30 % sonifiziert. Zuletzt wurde zu jeder Probe 37,5 µl 5x Laemmli Puffer (s. Tabelle 10) hinzugefügt und die Proben wurden 10 Minuten bei 96 °C unter Schütteln aufgekocht. Nach dem Auskühlen wurden die Proteinproben bis zur weiteren Analyse bei –20 °C aufbewahrt.

3.6.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der denaturierten Proteinproben erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), wobei ein 12,5-prozentiges Trengel und ein 3-prozentiges Sammelgel verwendet wurden (s. Tabelle 20). Die Gele wurden zwischen Mini PROTEAN® Glasplatten mit 1,5 mm Abstandshaltern gegossen. Jede Probe wurde unmittelbar vor dem Laden von je 10 µl für 5 Minuten auf 96 °C aufgekocht, gevortext und zentrifugiert. Als Molekularmassenstandard wurden pro Gel zusätzlich je 2-mal 7,5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder geladen. Die Gelelektrophorese in SDS-Laufpuffer (s. Tabelle 10) erfolgte für 40 Minuten bei 50 V und weitere 50 Minuten bei 150 V.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Trengels (12,5 %) und des Polyacrylamid-Sammelgels (3 %)

Komponente	Trengel (12,5 %)	Sammelgel (3 %)
Tris-HCl, pH 6,8	-	0,55 M
Tris-HCl, pH 8,8	0,479 M	-
Rotiphorese Gel 40 % Acrylamid/Bisacrylamid	11 % (v/v)	11 % (v/v)
SDS, 20 %	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
APS	0,1 % (w/v)	0,1 % (w/v)
TEMED	0,2 % (w/v)	0,2 % (w/v)

3.6.3 Western Blot-Analyse

Zur Übertragung der nun nach Molekulargewichten aufgetrennten Proteine von den Gelen auf eine Polyvinylidendifluorid-Transfermembran (PVDF) wurde das Semi-Dry-Blotting-Verfahren angewendet. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst für 30 Sekunden in Methanol aktiviert und zusammen mit dem SDS-Gel und 2 1,5 mm-Gel-Blotting-Papieren in 1x Towbin-Puffer (s. Tabelle 10) mit zusätzlich 20 % Methanol equilibriert. Das SDS-Gel wurde auf der PVDF-Membran zwischen den 2 Gel-Blotting-Papieren platziert. Mittels des Trans-Blot® Turbo™ Transfer Systems wurden die Proteine bei einer Laufzeit von 40 Minuten bei 24 V auf die PVDF-Membranen übertragen. Im Anschluss wurden die Membranen 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Blocklösung aus TBS-T (s. Tabelle 10) mit 5 % Milchpulver eingelegt und über Nacht mit der Primärantikörper-Lösung (Rhodopsin, s. Tabelle 21) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Membranen 3-mal je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit der Sekundärantikörper-Lösung inkubiert (s. Tabelle 21). Nach erneutem 3-maligen Waschen der Membranen für je 5 Minuten wurde die Chemilumineszenz mit Hilfe des Clarity™ Western ECL Substrats aktiviert. Die Proteinbanden wurden mit dem Odyssey® Fc Imaging System detektiert und mit Hilfe der Software Image Studio (Ver 5.2) visualisiert. Da das Clarity Max™ Western ECL Substrat eine höhere Sensitivität aufweist, wurde es bei einer durch das übliche Substrat zu geringer Intensität des Signals zusätzlich eingesetzt. Anschließend wurden die Membranen erneut 3-mal je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit der Primärantikörper-Lösung gegen Beta-Aktin inkubiert. Die nächsten Arbeitsschritte bis zur Aufnahme des Signals erfolgten analog der obigen Beschreibung.

Tabelle 21: Zusammensetzung der für die Westernblot-Analyse verwendeten Antikörper-Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
Primärantikörper-Lösung	Primärer Antikörper Milchpulver, Blotting Grade TBS-T	Konzentration s. Tabelle 3
Sekundärantikörper-Lösung	Sekundärer Antikörper	Konzentration s. Tabelle 4

Milchpulver, Grade	Blotting	5 % (w/v)
TBS-T		

3.7 Quantitative Analyse der mRNA-Expression von RPE-Marker-Genen

Die Expression von RPE-Marker-Genen wurde in 2 Experimenten untersucht. Zum einen wurde die Expression von *BEST1* und *RPE65* der zuvor kryokonservierten und 6 Wochen auf Transwell-Filtern kultivierten RPE-Zellen analysiert. Zum anderen standen nicht kryokonservierte bRPE-Zellen (Passage 2) zur Verfügung, die während ihrer Differenzierung mit oder ohne Zusatz von 10 mM Nicotinamid auf 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert wurden. Hier wurde zusätzlich die Expression von *PME1* und *MITF* überprüft.

3.7.1 Isolation der mRNA

Zur Isolation der Gesamt-mRNA wurde das PureLink™ RNA Mini Kit verwendet. Zur Vermeidung eines Abbaus der mRNA durch Ribonukleasen während der Isolation wurde der Arbeitsplatz zuvor mit RNase AWAY® gereinigt und es wurden bei allen Arbeitsschritten Handschuhe getragen.

Zur Sicherung der mRNA der RPE-Zellen wurden die Zellen mit einem Zellschaber unter Zugabe von 350 µl Lyse-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol von 12-Well-Transwell-Filtern oder 6-Well-Zellkulturplatten gelöst. Das Zelllysat wurde in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß überführt und der Filter nochmals mit 350 µl Lyse-Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol gespült. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben unmittelbar auf Trockeneis und im Anschluss bei -80 °C konserviert.

Nach dem Auftauen der Gesamt-mRNA-Proben auf Eis wurden die Zellmembranen der in 700 µl Lysepuffer mit 1 % β-Mercaptoethanol gelösten Zellen entweder durch QIAshredder® Säulen oder durch Metallkugeln aufgebrochen, 3 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand im Verhältnis 1:1 in 70 % Ethanol gelöst. Die restlichen Arbeitsschritte entsprachen mit kleineren Anpassungen den Schritten 2 bis 6 des Protokolls des Herstellers (76) (s. Tabelle 22). Zuletzt wurde die mRNA-Konzentration und die Reinheit der mRNA-Probe am NanoDrop ND-1000

Spektrophotometer gemessen und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tabelle 22: Arbeitsschritte zur Isolation der mRNA

Arbeitsschritte	
mRNA-Bindung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Überführen von 700 µl Zelllysat in ein Sammelröhrchen mit Filter 2. bei 12.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugieren und Überstand verwerfen 3. Schritt 1. und 2. mit den restlichen 700µl Zelllysat wiederholen
Waschung der mRNA und enzymatischer DNA-Verdau	<ol style="list-style-type: none"> 4. Zugabe von 350 µl Wasch-Puffer-I 5. bei 12.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugieren 6. Zugabe von 80 µl RNase-Free DNase Set (10 µl DNase in 70 µl RDD-Puffer/Probe) und Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten 7. Zugabe von 350 µl Wasch-Puffer-I 8. bei 12.000 rpm für 1 Minute zentrifugieren 9. Überstand verwerfen und Filter in neuem Sammelröhrchen platzieren 10. Zugabe von 500 µl Wasch-Puffer-II 11. bei 12.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugieren und Überstand verwerfen 12. Schritt 10. und 11. 1-mal wiederholen
Eluieren der mRNA	<ol style="list-style-type: none"> 13. bei 12.000 rpm für 2 Minuten zentrifugieren 14. Verwerfen des Sammelröhrechens und Überführung des Filters in ein Auffangröhrechen 15. Zugabe von 30 µl (12-Well-Transwellfilter) bzw. 35 µl (6-Well-Zellkulturplatte) mRNAse freiem H₂O und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Minute 16. bei 12.000 rpm für 2 Minuten zentrifugieren 17. Filter aus dem Auffangröhrechen herausnehmen und Eluat mit Pipette aufnehmen 18. Filter zurück in das Auffangröhrechen setzen und Eluat mittig in den Filter pipettieren. Im Anschluß 1 Minute bei Raumtemperatur inkubieren und Schritt 16. 1-mal wiederholen

3.7.2 Synthese der cDNA

Zur Synthese der cDNA aus den isolierten mRNA-Proben wurde das RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit verwendet. Pro Experiment wurden zwischen 400 ng und 1500 ng mRNA in cDNA umgeschrieben. Bei wenigen Ausnahmen, in der die mRNA-Konzentration der Probe sehr gering war, wurde die jeweilig höchstmögliche Menge in cDNA umgeschrieben. Die mRNA-Proben wurden mit RNase freiem H₂O auf dieselbe Endkonzentration verdünnt und mit 1 µl Random Hexamer Primer 5 Minuten bei 65 °C inkubiert (s. Schritt 1 Tabelle 23). Anschließend wurden die restlichen Komponenten des Reaktionsansatzes hinzugefügt (s.

Tabelle 24) und das Thermocycler-Programm fortgesetzt (s. Schritt 2 Tabelle 23). Zuletzt wurden die cDNA-Proben mit RNase freiem H₂O auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Bei einer geringeren Konzentration als 20 ng/µl erfolgte keine weitere Verdünnung.

Tabelle 23: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Dauer in min
Schritt 1: Annealing	65	5
Schritt 2: cDNA-Synthese und Hitzeinaktivierung	25	10
	42	60
	70	15
	4	-

Tabelle 24: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen in µl
5x Reaktionspuffer	4
dNTPs	2
RevertAid Reverse Transkriptase	1

3.7.3 mRNA-Expressionsanalyse mittels quantitativer Echtzeit-RT-PCR (qRT-PCR)

Für die mRNA-Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurden grundsätzlich je 2,5 µl cDNA in Triplikaten auf eine MicroAmp™ optische 384-Well-Reaktionsplatte pipettiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz hinzugefügt, der zuvor für jedes untersuchte Gen unter Verwendung der zugehörigen Oligonukleotidprimer und Sonden separat erstellt wurde (s. Tabelle 25). Die qRT-PCR wurde unter Verwendung des entsprechenden Programms (s. Tabelle 26) mit Hilfe des QuantStudio® 5 Real-Time PCR Systems durchgeführt. Die Genexpression wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (77) zuerst auf das Haushaltsgen *HPRT1* normalisiert. Anschließend wurden die Werte der bRPE-Zellen entweder auf den mittleren Schwellenwertzyklus der iPS-Zellen oder auf den mittleren Schwellenwertzyklus der kRPE-Zellen normalisiert.

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die qRT-PCR

Komponente	Volumen in µl
Taykon Low ROX Probe 2x MasterMix dTTP blue	5
Primer forward (1:10 verdünnt)	1
Primer reverse (1:10 verdünnt)	1
Sonde (1:4 verdünnt)	0,125
Millipore H ₂ O	0,375

Tabelle 26: Programm für die qRT-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur in °C	Dauer in Sekunden
Schritt 1: Denaturierung	95	40
Schritt 2: Annealing	60	60
Schritt 3: Elongation	72	120

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchlaufen

3.8 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten

Die erhobenen $\Delta\Delta Ct$ -Werte zur mRNA-Expressionsanalyse und die TEER-Messwerte wurden mithilfe des Statistikprogramms IBM SPSS Statistics 25 ausgewertet. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test (78,79). Der Levene-Test diente zur Überprüfung der Daten auf Varianzhomogenität (80). Waren diese Voraussetzungen für einen parametrischen Test zum Vergleich der Mittelwerte erfüllt, wurde bei einem Vergleich zwischen 2 unabhängigen Stichproben der zweiseitige t-Test verwendet, bei einem Vergleich zwischen mehr als 2 unabhängigen Stichproben die einfaktorielle ANOVA (81). Als Maß der Effektstärke wurde Cohens d bei einem signifikanten t-Test berechnet und nach Cohen interpretiert ($d = 0,2$: kleiner Effekt; $d = 0,5$: mittlerer Effekt; $d = 0,8$: großer Effekt) (82). Signifikante Ergebnisse bei der einfaktoriellen ANOVA wurden mit dem Tukey-HSD Post-hoc-Test ausgewertet. Als Maß der Effektstärke wurde ϵ^2 berechnet. Als Grenzen für die Größe des Effekts wurden nach Cohen $\epsilon^2 = 0,01$ für einen kleinen Effekt, $\epsilon^2 = 0,06$ für einen moderaten Effekt und $\epsilon^2 = 0,14$ für einen großen Effekt gewählt (82). Waren die Varianzen ungleich oder die Daten nicht normalverteilt, wurden die robustere Welch-ANOVA und der Games-Howell Test ausgewertet (83,84). Um Unterschiede bezüglich der zentralen Tendenzen zwischen mehr als 2 Gruppen aufzudecken, wurden als nicht-parametrische Testverfahren bei ungleicher Varianz und nicht normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis-Test und als Post-hoc-Test der Dunn-Bonferroni-Test verwendet (85–87). Anhand der signifikanten Werte des Dunn-Bonferroni-Tests wurden Effektstärken ($\hat{\epsilon}r$) berechnet und gemäß der Einteilung von Cohen (1992) beurteilt ($r \geq 0,1$: geringer Effekt; $r \geq 0,3$: mäßiger Effekt; $r \geq 0,5$: starker Effekt) (88). Die Daten wurden mittels Word, Excel, IBM SPSS Statistics 25 und CorelDRAW 2021 graphisch dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Differenzierung der iPS-Zellen zu bRPE-Zellen und retinalen Organoiden

Im ersten Teil der Arbeit sollte die zuverlässige Generierung von bRPE mithilfe des angepassten Protokolls zur Differenzierung von retinalen Organoiden durch weitere Differenzierungen bestätigt werden. Aus allen verwendeten iPS-Zelllinien konnten mit Hilfe des Differenzierungsprotokolls zwischen 6 bis 10 retinale Organoide (s. Ergänzende Abbildung 1A, Appendix) und bRPE-Zellen (s. Ergänzende Abbildung 1B, Appendix) gewonnen werden. Aufgrund mikrobiologischer Kontaminationen der bRPE-Zellen durch Pilze (mikroskopisch sichtbare Hyphen) konnte jedoch lediglich 1 bRPE-Zellreplikat (Zelllinie: NJ111) in Flüssigkeitstickstoff konserviert werden. Die kontaminierten bRPE-Zellen wurden verworfen und nicht in Experimenten eingesetzt. Prinzipiell wirkten die bRPE-Zellen, die ab dem 23. bzw. 24. Tag der Differenzierung 10 mM Nicotinamid erhielten, deutlich stärker pigmentiert als diejenigen, die ohne Nicotinamid differenziert wurden und zeigten die erwünschte hexagonale Morphologie von RPE-Zellen (s. Ergänzende Abbildung 1B, Appendix).

4.2 Charakterisierung der bRPE-Zellen

4.2.1 Anstieg des TEER

Der erste Schritt zur Charakterisierung der bRPE-Zellen umfasste die Überprüfung ihrer Barrierefunktion. Über einen Zeitraum von 6 Wochen wurde dazu der TEER, der in ihrem jeweiligen Standardmedium auf Transwell-Filtrern kultivierten bRPE-Zellen (Zelllinien: MK26_1, MK27_1, NG2_1, NG3_1, NJ105_2 und NJ111_1, n = 6) und kRPE-Zellen (Zelllinien: MK26, MK27, NG3, NJ105 und NJ111, n = 5), erhoben. Um zusätzlich in Hinblick auf eine künftige Co-Kultur den Einfluss von SMro auf die Barrierefunktion der bRPE-Zellen zu überprüfen, wurden nach abgeschlossener Umstellung des Mediums in Woche 4 an diesen Zellen ebenfalls TEER-Messungen durchgeführt (technische Replikate der oben genannten bRPE-Zelllinien, n = 6).

Im beobachteten Zeitraum von 6 Wochen stiegen die TEER-Messwerte sowohl bei den mit SMk kultivierten kRPE- als auch bei den mit SMb kultivierten bRPE-Zellen an (**Abbildung 5**). Außer in Woche 1, in der die in SMb kultivierten bRPE-Zellen einen

statistisch signifikant niedrigeren TEER von durchschnittlich $43,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ zeigten (95 % - CI [7,43; 78,57]), $t(9) = 2,73$, $p = 0,023$, $d = 0,678$), ergaben sich keine weiteren relevanten Unterschiede zwischen denen im jeweiligen Standardmedium kultivierten bRPE- und kRPE-Zellen. Allerdings zeigten die bRPE-Zellen im Durchschnitt niedrigere Messwerte als die kRPE-Zellen, mit einer hohen Varianz der Werte zwischen den einzelnen Differenzierungen (s. Ergänzende Tabelle 1, Appendix). So betrug der geringste TEER-Messwert in Woche 6 $13,04 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und der höchste $548,86 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Im Gegensatz dazu fielen die TEER-Messwerte der bRPE-Zellen stark ab, nachdem sie in SMro kultiviert wurden. Bereits unmittelbar nach der Umstellung des Mediums in Woche 4 demonstrierten sie im Vergleich zu den kRPE-Zellen einen um durchschnittlich $201,30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ niedrigeren TEER-Messwert (95 % - CI [6,82; 395,79], $F(2; 14) = 3,92$, $p = 0,042$, $\epsilon^2 = 0,268$). In Woche 5 und 6 ergaben sich im Vergleich zu den kRPE-Zellen ebenfalls signifikant geringere TEER-Messwerte für die in SMro kultivierten bRPE-Zellen (Woche 5: 95 % - CI [112,40; 322,94], $F(2; 6,74) = 22,66$, $p = 0,003$, $\epsilon^2 = 0,363$; Woche 6: 95 % - CI [112,01; 372,14], $F(2; 8,00) = 14,63$, $p = 0,002$, $\epsilon^2 = 0,34$).

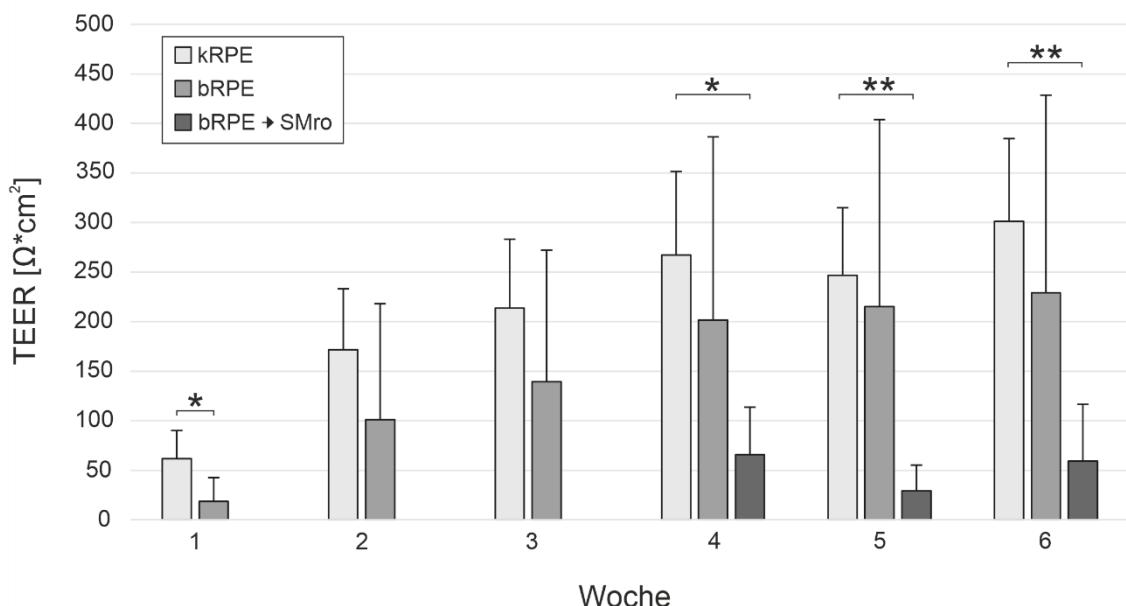


Abbildung 5: Vergleichbarer Anstieg der TEER-Messwerte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei bRPE- und kRPE-Zellen

Die TEER-Messwerte wurden wöchentlich im Zeitraum der 6-wöchigen Kultur der Zellen auf Transwell-Filtern erhoben. Gezeigt sind die gemittelten TEER-Messwerte der in Standardmedium kultivierten kRPE-Zellen (kRPE, Zelllinien: MK26, MK27, NG3, NJ105, NJ111, $n = 5$) und bRPE-Zellen (bRPE, Zelllinien: MK26_1, MK 27_1, NG2_1, NG3_1, NJ105_2, NJ111_1, $n = 6$). Nachdem in Woche 4 die Hälfte der bRPE-Zellen an SMro gewöhnt

wurde, wurden für diese ebenfalls TEER-Messwerte erfasst (bRPE → SMro, Zelllinien: MK26_1, MK27_1, NG2_1, NG3_1, NJ105_2, NJ111_1, n = 6). Über den beobachteten Zeitraum stiegen die TEER-Messwerte bei den im Standardmedium kultivierten KRPE- und bRPE-Zellen in einem vergleichbaren Ausmaß an. Die Umstellung zu SMro führte dagegen unmittelbar nach der Umstellung in Woche 4 zu einem signifikanten Abfall der TEER-Messwerte. Diese zeigten auch in Woche 5 und 6 ein vergleichbar niedriges Niveau. Die statistische Signifikanz zwischen den Gruppen ist als * für p < 0,05; und ** für p < 0,01 angegeben. Die Daten sind als Mittelwert (+ Standardabweichung) dargestellt.

4.2.2 Expression und korrekte Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1

Der nächste Schritt zur Charakterisierung der bRPE-Zellen umfasste die Analyse der Expression und Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und des Tight Junction Markers ZO-1. Die nicht kryokonservierten bRPE-Zellen (Zelllinien: NG2_1, NG2_2, NG3_2, NG3_3, MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NJ105_2, NJ105_3 und NJ111_2; Übersicht über die Färbung der einzelnen experimentellen Replikate s. Ergänzende Tabelle 2, Appendix), die nach 6-wöchiger Kultur auf Transwell-Filtern je am Tag 105 der Differenzierung geerntet wurden, zeigten unabhängig von den beiden Kultivierungsbedingungen in SMb oder der Umstellung von SMb auf SMro (SMb → SMro) durchgängig die Expression von typischen RPE-Marker-Proteinen, wie BEST1, der beta1-Untereinheit der transmembranösen Natrium-Kalium-ATPase (ATP1B1) (7,89,90) und des im Zellkern lokalisierten Transkriptionsfaktors OTX2 (91,92) (**Abbildung 6 A-F**). Wie erwartet, war BEST1 basolateral (**Abbildung 6 A-E**) und ATP1B1 apikal an der Zellmembran lokalisiert (**Abbildung 6 C, E**). OTX2 zeigte die korrekte Lokalisation im Zellkern (**Abbildung 6 A, B, D, F**). Die Lokalisation von ATP1B1 an der Zellmembran war bei der bRPE-Zelllinie MK26_2 (**Abbildung 6 C**) dabei stärker ausgeprägt als bei NJ105_2 (**Abbildung 6 E**). Alle untersuchten Zellen zeigten die korrekte apikal-laterale Lokalisation des Proteins ZO-1 und damit die typische hexagonale Morphologie von RPE-Zellen (**Abbildung 6 A-E**). Allerdings wirkten die bRPE-Zellen, die in SMro kultiviert wurden, in ihrer räumlichen Ausdehnung insgesamt kleiner. Auf die Expression und Lokalisation der übrigen untersuchten Proteine schien SMro keinen relevanten Einfluss zu nehmen. Die Zellreplikate, die als Kontrolle bei sonst identischer Behandlung nicht mit der Primärantikörper-Lösung gefärbt wurden, zeigten keine spezifische Färbung (**Abbildung 6 G**).

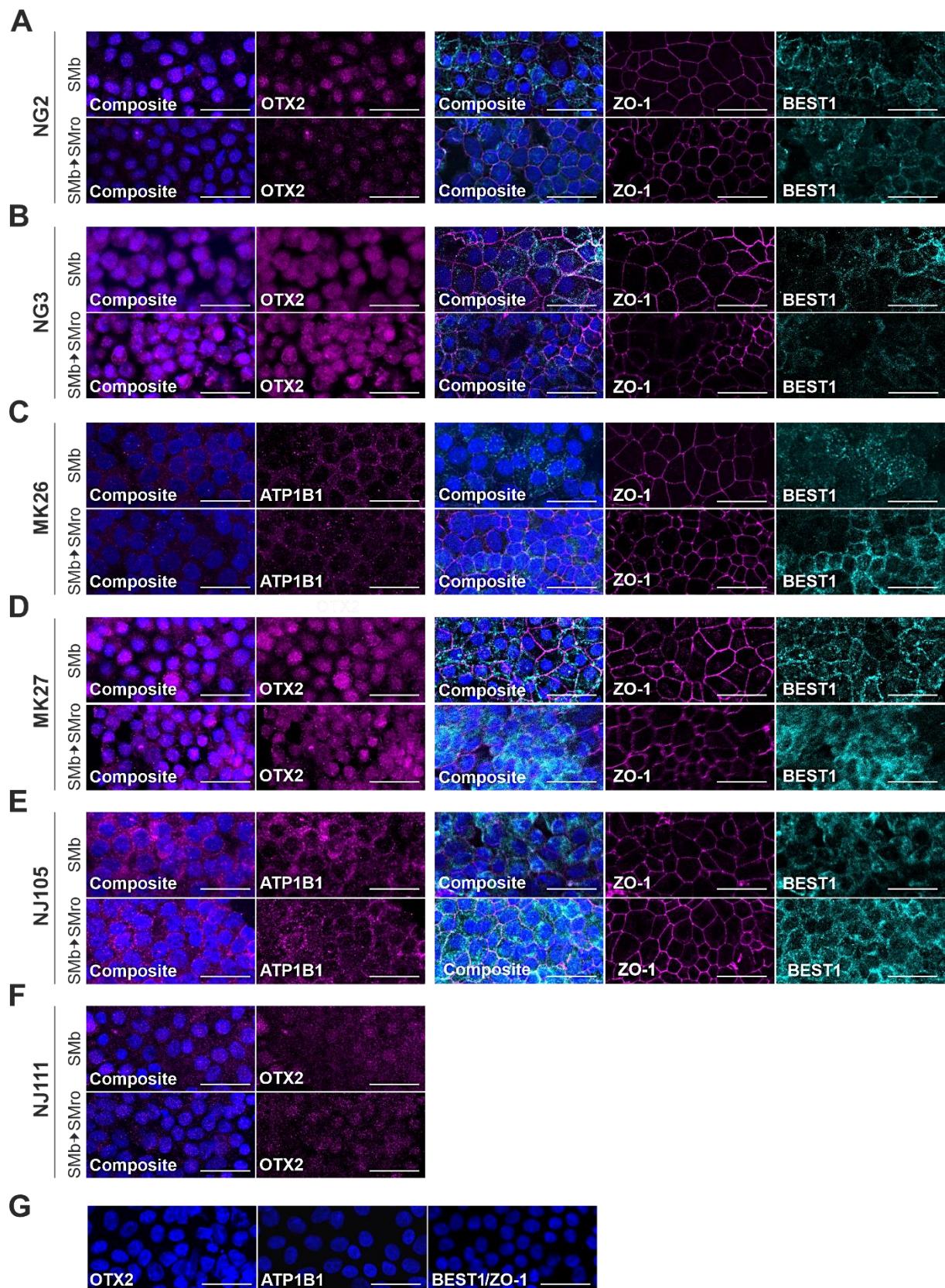


Abbildung 6: Expression und korrekte Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und dem Tight-Junction-Protein ZO-1 bei bRPE-Zellen

Gezeigt sind konfokale Fluoreszenzaufnahmen der auf Transwell-Filtern kultivierten bRPE-Zellen, die mit Antikörpern gegen OTX2, ATP1B1, ZO-1 (magenta) und BEST1 (cyan) gefärbt wurden. Die Zellnuklei wurden mit

DAPI (blau) gegengefärbt. Insgesamt exprimierten alle bRPE-Zellen (**A-F**) die untersuchten RPE-Marker-Proteine und ZO-1 in der korrekten Lokalisation. So waren ZO-1, ATP1B1 und BEST1 korrekt an der Zellmembran und OTX2 korrekt im Zellkern lokalisiert. Die Lokalisation von ATP1B1 an der Zellmembran war bei der bRPE-Zelllinie MK26_2 (**C**) dabei stärker ausgeprägt als bei NJ105_2 (**E**). Insgesamt erscheinen die bRPE-Zellen, die mit SMro (SMb → SMro) kultiviert wurden, kleiner. (**G**) Als Kontrolle wurde je ein Replikat nur mit der Sekundärantikörper-Lösung gefärbt. Repräsentativ ist für jede verwendete Primärantikörper-Lösung ein zusammengesetztes Bild (Composite) dargestellt. Maßstabsleiste: 30 µm. Vergrößerung: 20-fach.

Um zusätzlich zu überprüfen, ob die bRPE-Zellen neben SMro auch SMk und die Konservierung in Flüssigstickstoff tolerieren, wurden die kryokonservierten bRPE-Zellen (Zelllinien: MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1 und NJ111_2) und kRPE-Zellen (Zelllinien: MK26, MK27, NG3, NJ105 und NJ111) nach 6-wöchiger Kultur auf Transwell-Filtern mit Antikörpern gegen ZO-1 gefärbt.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten unabhängig von dem verwendeten Zellkulturmedium die korrekte Lokalisation des Proteins an der Zellmembran (**Abbildung 7 A-F**). Ebenso wie in **Abbildung 6** wirken die bRPE-Zellen, die in SMb oder SMk kultiviert wurden, im optischen Vergleich größer als die bRPE-Zellen, die über einen Zeitraum von 3 Wochen in SMro kultiviert wurden. Zwischen den kRPE-Zellen und bRPE-Zellen, die in SMk oder SMb kultiviert wurden, ergaben sich im optischen Vergleich keine relevanten Unterschiede.

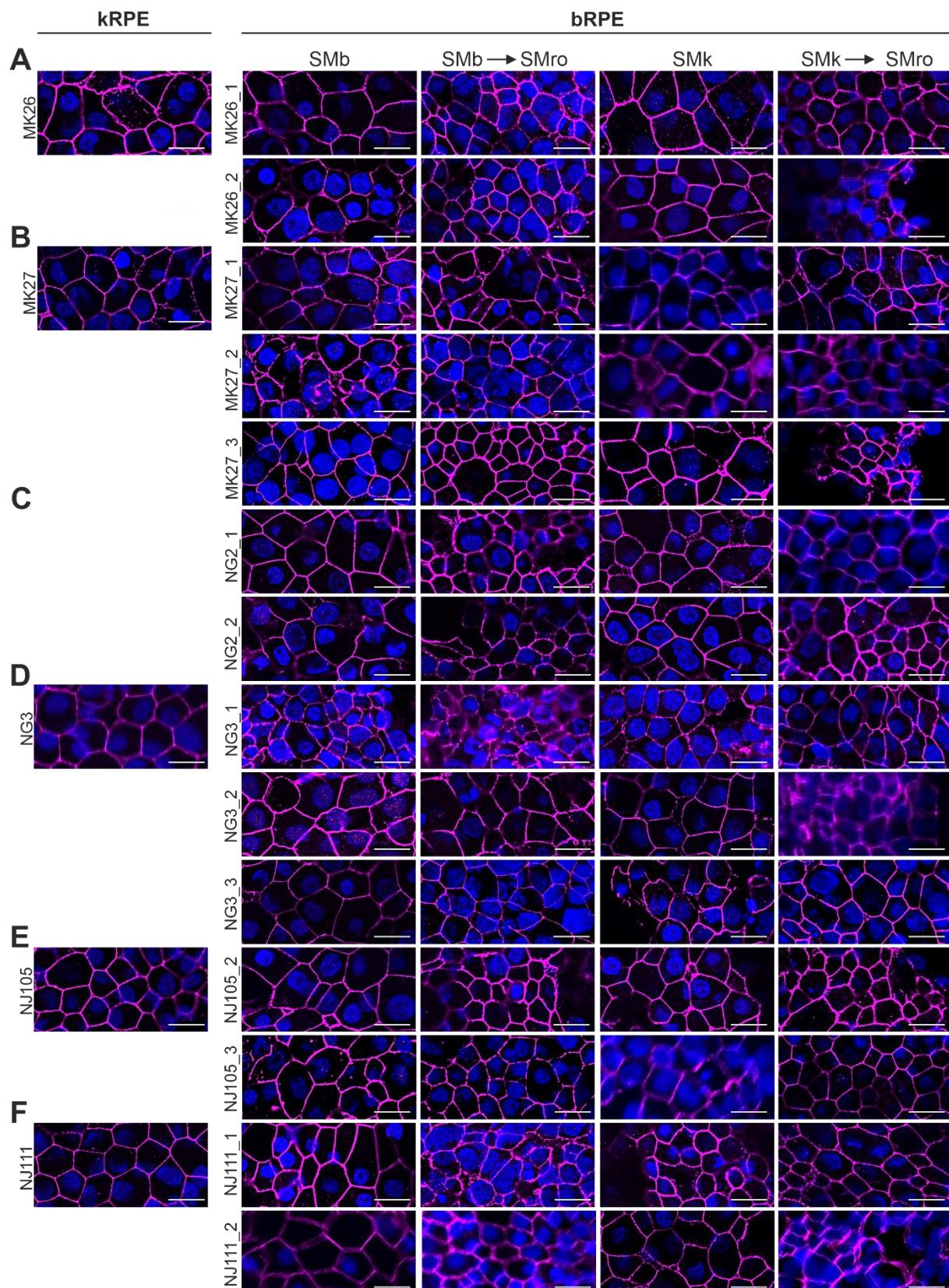


Abbildung 7: Expression und korrekte Lokalisation von ZO-1 bei bRPE-Zellen nach Kryokonservierung

Gezeigt sind konfokale Fluoreszenzaufnahmen von zuvor kryokonservierten RPE-Zellen, die nach 6-wöchiger Kultur auf Transwell-Filters mit Antikörpern gegen ZO-1 (magenta) gefärbt wurden. Die Zellkerne wurden mit

DAPI (blau) gegengefärbt. Sowohl die kRPE-Zelllinien (**A**, **B**, **D**, **E**, **F**) als auch die bRPE-Zelllinien (**A-F**; einzelne experimentelle Replikate sind durch Nummern gekennzeichnet) zeigten unabhängig von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen durchgängig die Expression von ZO-1 in der erwarteten Lokalisation an der Zellmembran. Die bRPE-Zellen, die mit SMk oder SMb kultiviert wurden, wirken im optischen Vergleich größer als nach Kultur der Zellen mit SMro (SMb → SMro oder SMk → SMro). Die Aufnahmen wurden mit 40-facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl erstellt. Maßstabsleiste: 15 µm.

4.2.3 Phagozytose-Experimente mit porzinen POS

Da die Phagozytose von POS eine der wichtigsten Eigenschaften von RPE-Zellen *in vivo* darstellt, wurde im nächsten Schritt zur Charakterisierung der bRPE-Zellen deren Fähigkeit zur Phagozytose von porzinen POS mittels Westernblot-Analyse überprüft. Gezeigt ist die Internalisierung der POS nach 2 Stunden Inkubation mit porzinen POS (entspricht der jeweiligen 0 h Probe) und deren Degradation nach weiteren 4 Stunden (entspricht der jeweiligen 4 h Probe) Inkubation der Zellen für die in SMk kultivierten kRPE-Zellen (Zelllinien: MK26, MK27, NJ111 und NJ105) und die in SMro kultivierten bRPE-Zellen (Zelllinien: MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NG2_1, NG2_2, NJ111_1, NJ111_2, NJ105_1 und NJ105_2) (**Abbildung 8**). Die PVDF-Membranen wurden mit Antikörpern gegen das POS-spezifische Protein Rhodopsin und als Ladekontrolle mit Beta-Aktin inkubiert. Alle kRPE und bRPE-Zelllinien zeigten eine Färbung gegen Beta-Aktin. Bei den kRPE-Zelllinien ist zu keinem Zeitpunkt eine Färbung gegen Rhodopsin erkennbar. Im Gegensatz dazu zeigten die bRPE-Zelllinien durchschnittlich zum Zeitpunkt der Internalisierung (0 h) ein stärkeres Signal für die Färbung gegen Rhodopsin als nach weiteren 4 Stunden Inkubation. Auch hier war wiederum eine hohe Varianz zwischen den einzelnen bRPE-Zellreplikaten zu beobachten. So ist zum Beispiel bei MK27_1 nahezu keine Abschwächung des Signals für die Färbung gegen Rhodopsin festzustellen, während bei dem 2. und 3. Replikat von MK27 nach 4 Stunden keine Färbung gegen Rhodopsin sichtbar ist.

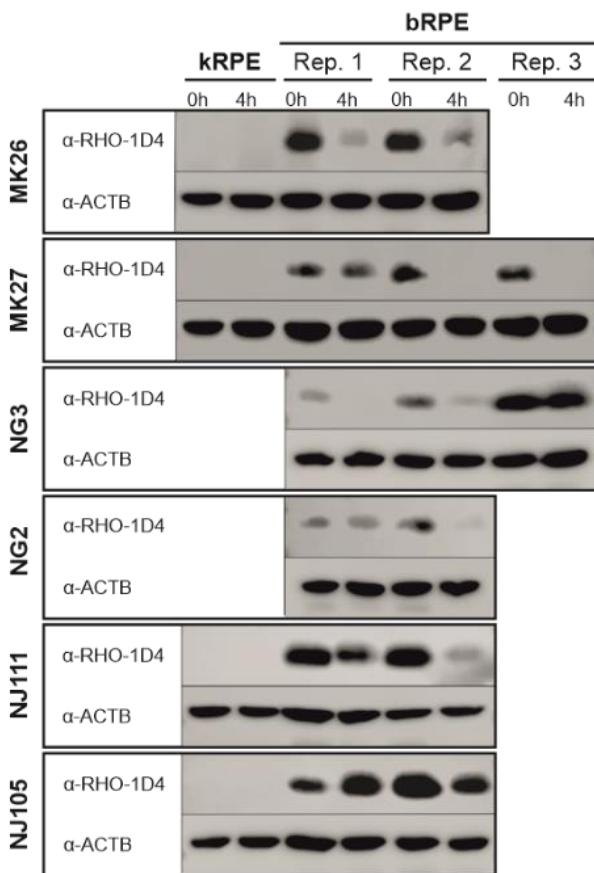


Abbildung 8: Phagozytose-Experimente mit porzinen POS

Vier kRPE-Zelllinien (MK26, MK27, NJ111 und NJ105) sechs bRPE-Zelllinien (MK26, MK27, NG3, NG2, NJ111 und NJ105), bestehend aus 2 bis 3 experimentellen Replikaten (Rep.), wurden mit porzinen POS inkubiert. Mit Hilfe der Westernblot-Analyse wurden das POS-spezifische Protein Rhodopsin-1D4 (α -RHO-1D4; 47 kDa) und als Ladekontrolle Beta-Aktin (α -ACTB; 43 kDa) detektiert. Während die kRPE-Zelllinien zu keinem Zeitpunkt eine Rhodopsin-Färbung zeigten, war für alle bRPE-Zelllinien zum Zeitpunkt der Internalisierung (0 h) eine Färbung gegen Rhodopsin erkennbar. Nach 4 Stunden Inkubation (4 h) war die Färbung gegen Rhodopsin durchschnittlich abgeschwächt oder nicht mehr sichtbar.

4.2.4 Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen

Der letzte Schritt zur Charakterisierung der bRPE-Zellen umfasste die quantitative Analyse der Expression von RPE-Marker-Genen mittels qRT-PCR. Die Genexpression wurde unter Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (77) auf das Haushaltsgen *HPRT1* normalisiert. Anschließend wurden die Werte der bRPE-Zellen für die Analyse der Expression von *BEST1*, *RPE65*, *PMEL* und *MITF* auf den Schwellenwertzyklus der iPS-Zellen (s. Punkt 4.2.4.1 und Ergänzende Tabelle 3, Appendix) und für die Analyse der Expression von *BEST1* und *RPE65* auf den Schwellenwertzyklus der kRPE-Zellen (s. Punkt 4.2.4.2 und Ergänzende Tabelle 5, Appendix) kalibriert. Die iPS-Zellen dienten als negative, die kRPE-Zellen als positive Kontrolle.

4.2.4.1 Nachweis der Expression von *BEST1*, *RPE65*, *PMEL* und *MITF*

Die auf 6-Well-Zellkulturplatten kultivierten und am 105. Tag der Differenzierung geernteten bRPE-Zellen wiesen eine Expression der 4 untersuchten RPE-Marker-Gene auf, wobei die Werte sowohl zwischen den einzelnen Differenzierungen als auch in Hinblick auf das untersuchte Gen eine hohe Variabilität erkennen ließen (s.

Ergänzende Tabelle 4, Appendix). So zeigte sich für *BEST1* im Vergleich zu den iPS-Zellen eine im Mittel um den Faktor 26.000 und für *RPE65* um den Faktor 200.000 erhöhte Expression der Gene, während die Expression von *MITF* mit einem Faktor von 500 und *PMEL* mit einem Faktor von 100 im Vergleich zu den iPS-Zellen geringer ausfiel. Zudem zeigte sich für alle untersuchten Gene eine signifikant höhere relative Expression bei den bRPE-Zellen, die mit Nicotinamid differenziert wurden, sowohl im Vergleich zu den bRPE-Zellen, die ohne Nicotinamid differenziert wurden, als auch zu den iPS-Zellen derselben Klonnummern (**Abbildung 9 A-D**). So demonstrierten die bRPE-Zellen mit Nicotinamid eine signifikant höhere Expression von *BEST1* als die bRPE-Zellen ohne Nicotinamid ($z = 3,01$, $p = 0,008$, $r = 0,58$) und die iPS-Zellen ($z = 5,11$, $p = 0,000$, $r = 1,09$). Die bRPE-Zellen ohne Nicotinamid exprimierten außerdem signifikant mehr *BEST1* als die iPS-Zellen ($z = 2,46$, $p = 0,041$, $r = 0,54$). Ebenso war die Expression von *MITF*, *PMEL* und *RPE65* bei den bRPE-Zellen mit Nicotinamid im Vergleich zu den bRPE-Zellen ohne Nicotinamid (*MITF*: $z = 3,09$, $p = 0,006$; $r = 0,61$; *PMEL*: $z = 3,11$, $p = 0,005$, $r = 0,62$; *RPE65*: $z = 2,44$, $p = 0,045$, $r = 0,61$) und im Vergleich zu den iPS-Zellen signifikant erhöht (*MITF*: $z = 4,39$, $p = 0,000$, $r = 1,03$; *PMEL*: $z = 3,19$, $p = 0,004$, $r = 0,77$; *RPE65*: $z = 2,90$, $p = 0,011$, $r = 0,92$).

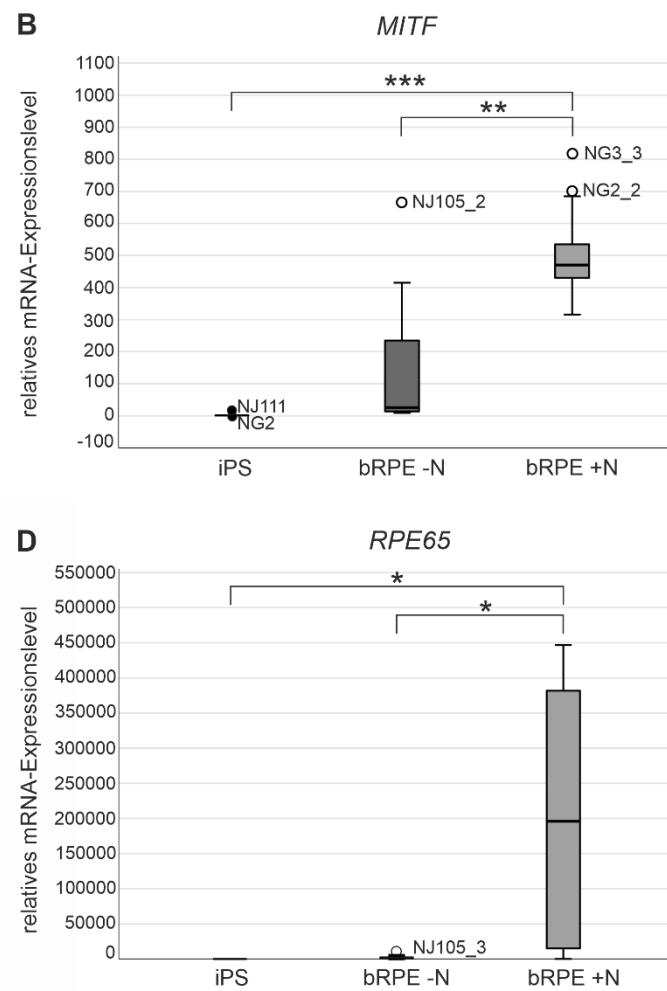
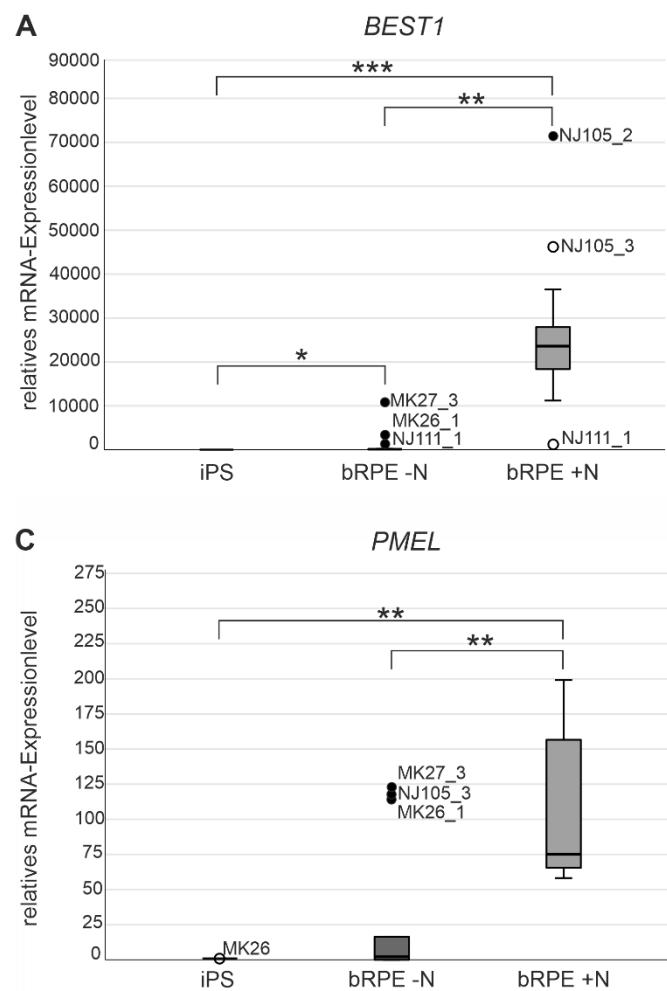


Abbildung 9: Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen bei bRPE-Zellen

Die mRNA der mit oder ohne Nicotinamid kultivierten bRPE-Zellen (bRPE +N oder -N) bzw. der iPS-Zellen (iPS) wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die relative mRNA-Expression für (A) *BEST1* (n (iPS) = 8, n (bRPE -N) = 13, n (bRPE +N) = 14), (B) *MITF* (n (iPS) = 5, n (bRPE -N) = 13, n (bRPE +N) = 13), (C) *PMEL* (n (iPS) = 5, n (bRPE -N) = 13, n (bRPE +N) = 12) und (D) *RPE65* (n (iPS) = 2, n (bRPE -N) = 8, n (bRPE +N) = 8) wurde mittels qRT-PCR in Triplikaten erhoben, unter Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (77) gegen das Haushalts-Gen *HPRT1* normalisiert. und anschließend auf den durchschnittlichen Schwellenwert-Zyklus der iPS-Zellen kalibriert. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, wobei die Box 50 % der mittleren Daten enthält. Die Länge der Whisker entspricht 1,5 Interquartilsabständen (IQA). Milde Ausreißer (1,5 bis 3 IQA) sind mit ○, starke Ausreißer (> 3 IQA) mit ● gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz ist als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben. Die bRPE-Zellen demonstrierten eine Expression aller 4 untersuchten Marker-Gene, wobei die Expression der Gene bei bRPE +N sowohl im Vergleich zu den iPS-Zellen als auch im Vergleich zu bRPE -N signifikant erhöht war.

4.2.4.2 Nachweis der Expression von *BEST1* und *RPE65*

Neben der Expression der RPE-Marker-Gene *BEST1* und *RPE65* wurde bei den kryokonservierten und 6 Wochen auf Transwellfiltern kultivierten bRPE-Zellen auch der Einfluss von SMro über einen Zeitraum von 3 Wochen und der Einfluss von SMk auf die bRPE-Zellen untersucht.

Insgesamt zeigten die in SMk oder SMb kultivierten bRPE-Zellen und die kRPE-Zellen eine vergleichbare Expression von *BEST1* und *RPE65*, die sich signifikant von der Expression der iPS-Zellen unterschied (*BEST1*: kRPE: $z = 3,88$, $p = 0,002$, $r = 1,37$; bRPE SMb: $z = 3,20$, $p = 0,021$, $r = 0,96$; bRPE SMk: $z = 3,95$, $p = 0,001$, $r = 1,06$; *RPE 65*: kRPE: $z = 4,15$, $p = 0,000$, $r = 1,57$; bRPE SMb: $z = 3,19$, $p = 0,021$, $r = 0,96$; bRPE SMk: $z = 3,67$, $p = 0,004$, $r = 1,02$) (**Abbildung 10 A, B**). Vor allem bei den bRPE-Zellen war jedoch eine hohe Varianz zwischen den einzelnen Replikaten zu beobachten (s. Ergänzende Tabelle 6, Appendix).

Im Gegensatz zur Kultivierung der bRPE-Zellen in SMk schien die Umstellung der bRPE-Zellen auf SMro einen negativen Einfluss auf die Expression der beiden Gene zu nehmen. So unterschied sich die Genexpression dieser Zellen für *BEST1* zwar nicht signifikant von der in SMb oder SMk kultivierten bRPE-Zellen und kRPE-Zellen, jedoch auch nicht signifikant von der in iPS-Zellen. Für *RPE65* ergab sich im Vergleich zu den kRPE-Zellen zudem eine statistisch signifikant geringere Expression bei den in SMro kultivierten bRPE-Zellen (SMb → SMro: $z = 3,39$, $p = 0,011$, $r = 0,85$; SMk → SMro: $z = 3,95$, $p = 0,001$, $r = 0,96$) (**Abbildung 10 B**). Weiterhin unterschied sich die mittlere Expression von *RPE65* statistisch signifikant zwischen den bRPE-Zellen, die in SMk kultiviert wurden und den in SMro kultivierten bRPE-Zellen (SMk → SMro: $z = 3,57$, $p = 0,005$, $r = 0,80$).

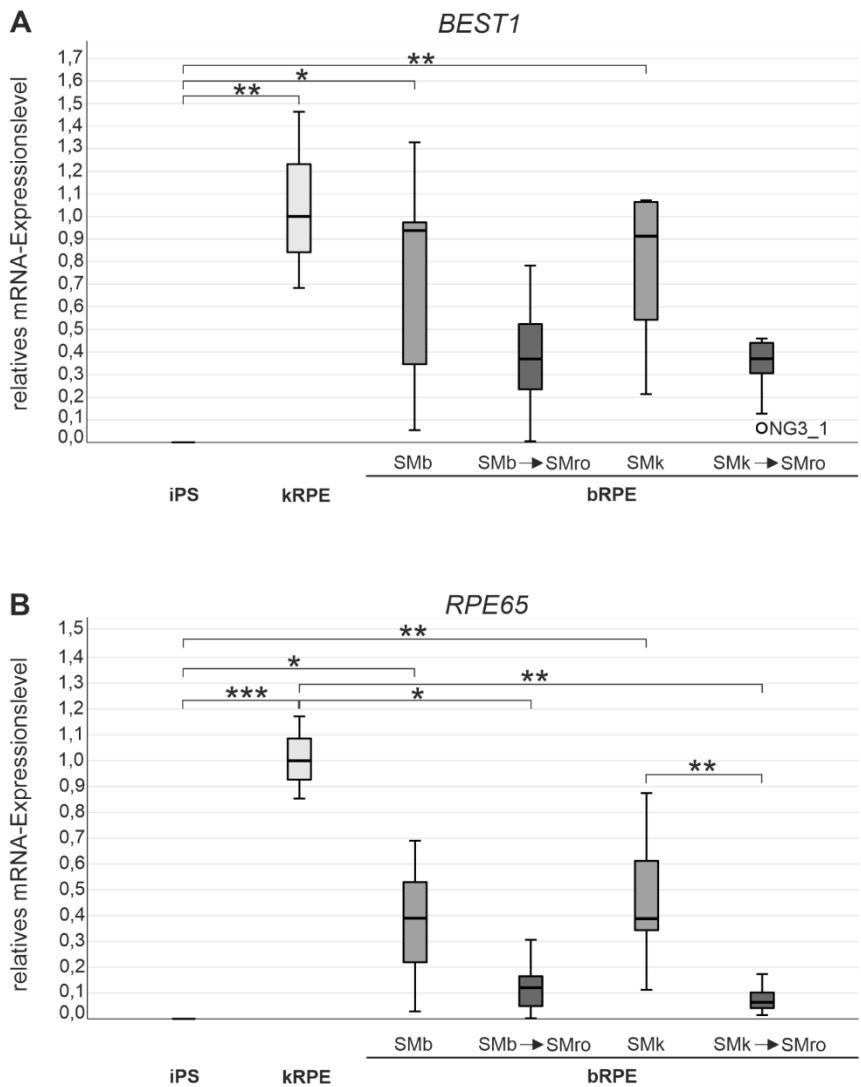


Abbildung 10: Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen bei bRPE-Zellen

Die mRNA der RPE-Zellen bzw. der iPS-Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die bRPE-Zellen wurden entweder in dem Standardmedium für bRPE-Zellen oder kRPE-Zellen (SMb bzw. SMk) kultiviert. 3 Wochen vor der Ernte der Zellen wurde die Hälfte der bRPE-Zellen auf SMro umgestellt (SMb → SMro bzw. SMk → SMro). Das relative mRNA-Expressionslevel für (A) *BEST1* und (B) *RPE65* wurde mittels qRT-PCR in Triplikaten erhoben. Unter Verwendung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode (77) wurden die Ergebnisse gegen das Haushalts-Gen *HPRT1* normalisiert und anschließend auf den durchschnittlichen Schwellenwert-Zyklus der kRPE-Zellen kalibriert. Die Daten sind als Boxplot dargestellt, wobei die Box 50 % der mittleren Daten enthält. Die Länge der Whisker entspricht 1,5 Interquartilsabständen (IQA). Milde Ausreißer (1,5 bis 3 IQA) sind mit ○ gekennzeichnet. Die statistische Signifikanz ist als * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$ angegeben. Insgesamt zeigen die in SMk oder SMb kultivierten bRPE-Zellen eine Expression beider Gene, die sich nicht wesentlich von der der kRPE-Zellen, aber signifikant von der der iPS-Zellen unterschied. SMro schien dagegen einen negativen Einfluss auf die Expression der RPE-Marker-Gene zu haben. So zeigte sich zum Beispiel im Vergleich zu den kRPE-Zellen eine signifikant geringere Expression von *RPE65* für die von SMb oder SMk auf SMro umgestellten bRPE-Zellen.

5. Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Zuverlässigkeit eines Protokolls, das die gleichzeitige Differenzierung von retinalen Organoiden und bRPE-Zellen aus iPS-Zellen beschreibt, durch 5 weitere unabhängige Differenzierungen bestätigt werden. Während pro Differenzierung zwischen 6 und 10 retinale Organoide generiert wurden, konnte die Zuverlässigkeit des Protokolls zur Generierung von bRPE aufgrund von mikrobiologischen Kontaminationen nur durch 1 weitere Differenzierung bestätigt werden. Die kontaminierten bRPE-Zellen wurden verworfen und nicht in Experimenten eingesetzt.

Im zweiten Teil der Dissertation sollte überprüft werden, ob bRPE-Zellen charakteristische Eigenschaften von RPE-Zellen aufweisen. Es konnte demonstriert werden, dass bRPE-Zellen auf den Ebenen der Protein- und mRNA-Expression und auf funktioneller Ebene typische Eigenschaften von RPE-Zellen zeigen, die auch nach Kryokonservierung erhalten bleiben. Zwischen den einzelnen bRPE-Zellreplikaten war jedoch eine hohe Variabilität beobachtbar, die potenziell auf verschiedene Einflussfaktoren zurückzuführen ist. Als mögliche Ursachen sind die Verwendung von iPS-Zellen unterschiedlicher Passagen, die individuelle Handhabung der iPS-Zellen während der Kultivierung, die späte Zugabe von Nicotinamid zum Zellkulturmedium sowie die eventuell unzureichende Effektivität der Maßnahmen zur Erhöhung der Reinheit der Differenzierungen zu nennen.

Im dritten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von SMk und der Einfluss von SMro auf die bRPE-Zellen untersucht. Während die Kultivierung in SMk keinen relevanten Einfluss auf die bRPE-Zellen auszuüben schien, zeigte sich bei längerer Kultur der Zellen in SMro ein negativer Einfluss hinsichtlich der erhobenen TEER-Messwerte und der Expression des RPE-Marker-Gens *RPE65*. Dies ist in Hinblick auf die geplante Co-Kultur mit retinalen Organoiden insofern problematisch, weil so nicht garantiert werden kann, dass das bRPE seine physiologische Funktion während einer längerfristigen Co-Kultur zuverlässig erfüllt.

5.1 Zuverlässigkeit des Protokolls zur Differenzierung der iPS-Zellen zu bRPE-Zellen und retinalen Organoiden

Die zuverlässige Generierung von RPE als Nebenprodukt des angepassten Protokolls bei der Differenzierung von retinalen Organoiden konnte in vorliegender Arbeit aufgrund Kontaminationen der ausdifferenzierten bRPE-Zellen durch mikroskopisch sichtbare Pilzhyphen nur durch eine weitere Differenzierung (Zelllinie NJ111) bestätigt werden. Als Quelle der Kontamination konnte der Inkubator identifiziert werden, der zur Kultivierung der bRPE-Zellen verwendet wurde. In einem nicht einsehbaren Zwischenraum zwischen den Inkubatorwänden und der Innenausstattung waren makroskopisch sichtbare Pilzkolonien vorhanden, die trotz regelmäßigen, routinemäßigen Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen zunächst unentdeckt blieben. Insgesamt stellen mikrobiologische Kontaminationen ein bekanntes, leider nicht seltenes Problem in der Zellkultur dar (93–95). Die gezeigte hexagonale Morphologie der Differenzierung von NJ111 entspricht einem charakteristischen Merkmal von RPE-Zellen und dient daher als wichtiger Indikator für die Zellidentität (75,96). Ein fördernder Einfluss von Nicotinamid auf die Differenzierung von iPS-Zellen zu RPE ist bereits mehrfach berichtet worden (68,97–102) und steht im Einklang mit der in dieser Arbeit beobachteten stärkeren Pigmentierung und hexagonalen Morphologie der mit 10 mM Nicotinamid differenzierten bRPE-Zellen und deren verstärkte Expression von RPE-Marker-Genen im Vergleich zu den ohne Nicotinamid differenzierten bRPE-Zellen.

Die durchgängig hohe Variabilität der erhobenen Werte der bRPE-Zellen hinsichtlich der Expression von RPE-Marker-Genen, des TEER und der Phagozytose von POS blieb jedoch auch bei Zugabe von 10 mM Nicotinamid bestehen. Einzelne bRPE-Zellreplikate zeigten in vorliegender Arbeit die Tendenz, dass diese neben geringen TEER-Messwerten auch eine geringere Expression von RPE-Marker-Genen und eine geringere Internalisierung oder Degradation von POS aufwiesen (z.B. NG3_1, NJ111_1). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Eine mögliche Erklärung wären strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen bei den verwendeten iPS-Zellen, die deren Differenzierungspotential stark beeinflussen können (103,104). Es wird berichtet, dass iPS-Zellen - neben bereits bei Reprogrammierung bestehenden chromosomalen Aberrationen (37) - diese zusätzlich durch längerfristige Kultivierung erwerben können, wobei die Wahrscheinlichkeit des

Auftretens mit der Anzahl der durchgeführten Zellpassagen steigt (105,106). Allerdings ist es schwierig vorherzusagen, ab welcher Passage mit solchen Veränderungen gerechnet werden muss. Brandl et al. (69) konnten chromosomal Aberrationen ab der 20. Passage von iPS-Zellen feststellen. Dagegen beobachteten Vaz et al. (106) bereits ab der 6. Passage und Mayshar et al. (105) ab der 5. Passage Chromosomenanomalien von iPS-Zellen. Da zur Differenzierung der bRPE-Zellen iPS-Zellen unterschiedlich hoher Passagen verwendet wurden, kann ein Einfluss auf die Varianz durch selektive Herabsetzung des Differenzierungspotentials nicht ausgeschlossen werden. Sowohl nicht ausdifferenzierte iPS-Zellen als auch ausdifferenzierte bRPE-Zellen mit schweren chromosomal Aberrationen könnten damit eine herabgesetzte Phagozytose von POS, erniedrigte Expression von RPE-Marker-Genen und geringe TEER-Messwerte erklären. Eine zweite Ursache für die Variabilität der RPE-Differenzierungen könnte die Handhabung der iPS-Zellen während der Kultivierung darstellen. Die sorgfältige, tägliche Entfernung von ausdifferenzierten Zellen während der Kultivierung von iPS-Zellen ist entscheidend, um ihre Pluripotenz zu erhalten (107). Die Qualität der iPS-Zellen ist daher stark von der individuellen Kompetenz und Erfahrung der jeweiligen Fachkraft abhängig, die die iPS-Zellen kultiviert (107). Wurden die ausdifferenzierten iPS-Zellen nicht immer vollständig entfernt, könnte dies einen negativen Einfluss auf einzelne Differenzierungen der bRPE-Zellen ausgeübt haben. Als dritte mögliche Ursache für die beobachtete Variabilität ist die späte Zugabe von Nicotinamid zum Zellkulturmedium der bRPE-Zellen zu nennen. Während Nicotinamid in einer Konzentration von 10 mM üblicherweise bereits ab Tag 0 der RPE-Differenzierung dem Zellkulturmedium zugesetzt wird (68,69,97,99), wurde es in vorliegender Arbeit erst ab dem 23. bzw. 24. Tag in der gleichen Konzentration hinzugegeben. Das Vitamin-B3-Derivat Nicotinamid spielt jedoch insbesondere in den ersten Tagen der Differenzierung eine entscheidende Rolle für die Entwicklung von RPE-Zellen (97,108,109). So berichten Idelson et al. (97), dass durch Zugabe von Nicotinamid ab Tag 0 bei der Differenzierung von hESC zu RPE die wesentlichen Schritte der embryonalen Entwicklung von RPE-Zellen erfolgreich im Labor nachgeahmt werden können. Zu Beginn der Differenzierung fördert Nicotinamid die Bildung gemeinsamer Vorläuferzellen, aus denen sich sowohl die neuronale Retina als auch RPE-Zellen entwickeln (97,108–110). Im weiteren Zeitverlauf scheint es die Bildung von RPE-Progenitor-Zellen zu begünstigen und gleichzeitig die Entstehung von

Progenitorzellen der neuronalen Retina zu unterdrücken (102). Ye et al. (102) zeigten, dass die Zugabe von 10 mM Nicotinamid ab dem 12. Tag der iPS-Zelldifferenzierungen die Bildung des frühen, RPE-spezifischen Progenitorzell-Markers *MITF* signifikant erhöht. Da im Rahmen dieser Arbeit jedoch parallel retinale Organoide differenziert wurden, war eine Suppression der Bildung von Progenitorzellen der neuronalen Retina vor Isolation der retinalen Organoide nicht erwünscht. Durch den späten Einsatz von Nicotinamid wurde allerdings das Risiko einer erhöhten Anzahl verbleibender Zellen anderen Ursprungs als RPE innerhalb der bRPE-Zelldifferenzierungen in Kauf genommen. Neben Progenitorzellen der neuronalen Retina könnten zudem auch die während der Differenzierung von RPE-Zellen häufig auftretenden, von der Morphologie fibroblastisch wirkenden Zellen (111), die Reinheit der bRPE-Zelldifferenzierungen beeinflusst haben. Zwei Maßnahmen zur Verbesserung der bRPE-Differenzierungen umfassten deshalb das Ausschneiden der pigmentierten Areale zwischen Tag 43 und Tag 50 der Differenzierung sowie die anschließende Inkubation der Zellaggregate mit TrypLE™ Select für 15 Minuten bei 37 °C. Diese Schritte sind in ähnlicher Form in vielen Protokollen zur Differenzierung von RPE-Zellen etabliert (68,69,97,98). Eine unzureichende Effektivität dieser beiden Maßnahmen könnte jedoch eine vierte Ursache für die beobachtete hohe Variabilität der bRPE-Zellreplikate darstellen. Foltz et al. (111) bemerkten in ihrer Studie zur schnellen, gerichteten Differenzierung von RPE, dass Zellen neuronaler Herkunft, wie Progenitorzellen der neuronalen Retina, unter einem Präparationsmikroskop opak erscheinen und sich zwischen RPE-Zellkolonien befinden. Im Gegensatz dazu wirken fibroblastenähnliche Zellen nahezu durchsichtig (111). Beim Ausschneiden der bRPE-Zellen könnten daher opak erscheinende Zellen neuronaler Herkunft und die an Fibroblasten erinnernden Zellen aufgrund ihrer schlechten Sichtbarkeit nicht bemerkt worden sein. Durch Überführung unterschiedlicher Mengen an bRPE-Zellen bei einzelnen Differenzierungen könnten also ebenfalls hohe Variationen in der Reinheit entstehen. Hinzu kommt, dass dunkel erscheinende Areale unter einem Präparationsmikroskop nicht zwingend aus RPE-Zellen bestehen müssen. Regha et al. (112) konnten zwischen RPE-Zellen liegende, kuppelartig angeordnete Zellkolonien eines anderen Ursprungszelltyps beobachten, deren dunkle Erscheinung auf das Phänomen der Mehrschichtigkeit und die damit veränderte Lichtbrechung zurückzuführen war. Auch solche aufgrund ihrer dunklen Erscheinung mit den pigmentierten Arealen der bRPE-

Zellen verwechselten Kolonien anderer Ursprungszelltypen könnten so versehentlich ausgeschnitten worden sein. Daher sollte die anschließende 15-minütige Inkubation der ausgeschnittenen pigmentierten Zellaggregate mit TrypLE™ Select in vorliegender Arbeit ein selektives Überleben der bRPE-Zellen bewirken. So ist bekannt, dass das Enzym Trypsin nicht nur interzelluläre Materie, sondern auch Zellen an sich schädigen kann und das Ausmaß dieser Zellschädigung mit der Länge der Inkubationszeit zunimmt (113). TrypLE™ Select ist ein rekombinantes Enzym nicht tierischen Ursprungs, das wie Trypsin Peptidbindungen an den C-terminalen Seiten von Lysin und Arginin spaltet (114). Nach Angaben des Herstellers Thermo Fisher Scientific ist eine 30 bis 45 minütige Inkubation mit TrypLE™ Select für die meisten adhärent kultivierten Zellen aber vollkommen unproblematisch, da durch die hohe Reinheit die Spezifität erhöht und Beschädigungen der Zellen im Gegensatz zu Trypsin reduziert werden könnten (114). Die erwünschte Sicherung des selektiven Überlebens der RPE-Zellen im Vergleich zu Zelltypen anderen Ursprungs scheint daher durch diesen Schritt nicht unbedingt gelungen zu sein.

In vorliegender Arbeit bleibt ungeklärt, welcher der diskutierten Einflussfaktoren die hohe Varianz zwischen den bRPE-Zellreplikaten verursacht hat. Für die bereits differenzierten bRPE-Zellen wäre eine Karyotypisierung denkbar, um strukturelle oder numerische Aberrationen der Chromosomen aufzudecken oder ausschließen zu können. Vorstellbar wäre außerdem, zunächst bRPE-Zellreplikate zu identifizieren, die eine mangelnde Qualität aufweisen. Ye et al. (102) berichten in Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit von variierenden TEER-Messwerten, selbst bei Differenzierungen von RPE aus derselben iPS-Zelllinie mit demselben Differenzierungsprotokoll. Da sich zeigte, dass RPE-Zelldifferenzierungen mit geringen TEER-Messwerten auch eine abnorme Struktur des Zytoskeletts aufwiesen, konnte mit Hilfe von computergestütztem maschinellem Lernen ein Modell entwickelt werden, das die Qualität von RPE-Zelldifferenzierungen hinsichtlich des zu erwartenden TEER-Messwerts zuverlässig anhand einer mikroskopischen Aufnahme der RPE-Zellen einschätzt. Die Etablierung eines computergestützten Modells nach Vorbild von Ye et al. (102) am Lehrstuhl für Humangenetik würde schnell und nicht-invasiv eine Qualitätseinschätzung der bRPE-Zellen erlauben. Zum einen könnten so bRPE-Zellreplikate unterschiedlicher Qualität in künftigen Studien gezielt gegenübergestellt werden. Zum anderen würde diese Maßnahme den Einsatz qualitativ hochwertiger bRPE-Zellen in Co-Kultur-Studien mit retinalen Organoiden

garantieren. Eine Überprüfung der Reinheit der bRPE-Zelldifferenzierungen in einer weiteren Studie könnte ergänzend zur Aufklärung der gefundenen hohen Varianz beitragen. Durch ein DNA-Mikroarray für Genexpression der bRPE-Zelldifferenzierungen könnte zum Beispiel gezielt die Expression von verschiedenen Genen untersucht werden, die als Marker für unterschiedliche Zelltypen dienen. Choudhary et al. (115) schlossen in ihrem Mikroarray für Genexpression zur Entwicklung der RPE-Zellen während der Differenzierung so die Untersuchung der Expression von iPS-Zell-Marker-Genen, Marker für die Entwicklung zu Neuroektoderm, zum embryonalen Augenbecher und RPE-Marker-Genen ein. Analog könnte die Expression der bRPE-Zellen von iPS-Zell-Marker-Genen, Marker für Fibroblasten und Zellen der neuronalen Retina überprüft werden.

Da das Differenzierungsprotokoll selbst die hohen Varianzen begünstigen könnte, wäre es sicherlich sinnvoll, dieses für künftige bRPE-Differenzierungen zu optimieren. Foltz et al. (111) empfehlen zum Beispiel, die Beurteilung und Markierung der auszuschneidenden RPE-Areale sowohl unter einem Lichtmikroskop als auch unter einem Präparationsmikroskop vorzunehmen. Durch diese leicht zu etablierende Maßnahme könnte die Überführung von anderen Zelltypen als RPE auf die neuen Zellkulturplatten eventuell weiter gesenkt werden. Eine alternative Methode, die Reinheit von RPE-Zelldifferenzierungen durch Anpassung des Protokolls zu erhöhen und damit auch die Varianz zwischen den Differenzierungen zu senken, beschreiben Hazim et al. (100). Sie inkubierten ARPE-19 Zellen innerhalb von 2 Wochen 3-mal für 10 Minuten mit TrypLE™ Select. Dadurch, dass die an Fibroblasten erinnernden Zellen im Gegensatz zu ARPE-19 Zellen nur eine schwache Adhärenz zum Boden der Zellkulturplatte aufwiesen, konnten diese mit TrypLE™ Select entfernt werden. Die Methode des selektiven Trypsinierens ließe sich möglicherweise auch in das Differenzierungsprotokoll der bRPE-Zellen integrieren. Ein guter Zeitraum wäre zwischen der 1. und 2. Passage der bRPE-Zellen. Auf diese Weise könnten die beim Ausschneiden der pigmentierten Areale versehentlich überführten anderen Zelltypen als RPE gezielt weiter reduziert werden.

5.2 Demonstration charakteristischer Eigenschaften von RPE-Zellen

Da bisher noch nicht untersucht wurde, ob bRPE-Zellen charakteristische Eigenschaften von RPE aufweisen, wurden diese in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf ihre mRNA- und Proteinexpression, Barrierefunktion und ihre Fähigkeit zur Phagozytose von POS analysiert.

5.2.1 Anstieg des TEER auf physiologische Werte

Die Barrierefunktion als wichtige Eigenschaft von RPE-Zellen wird in Charakterisierungsstudien von aus iPS-Zellen differenziertem RPE häufig mittels Messung des TEER überprüft (69,96,102,116–119). Die Messung des TEER ist eine sensitive und verlässliche Methode, um die Integrität und Permeabilität eines einschichtigen Epithels zu bestimmten (120). Allerdings können die Messwerte durch verschiedene Variablen wie die Umgebungstemperatur, die Anzahl der Zellpassagen, die Zusammensetzung des Zellkulturmediums, die Dauer der Zellkultur und auf die Zellen wirkende Scherkräfte beeinflusst werden (120). Ein Vergleich der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Werte mit Werten aus anderen Studien und ein Vergleich der in unterschiedlichen Zellkulturmedien kultivierten bRPE- und kRPE-Zellen ist deshalb nur begrenzt möglich. *In vitro* steigen die TEER-Messwerte von RPE-Zellen in den ersten 6 Wochen der Kultur auf Transwell-Filtern üblicherweise an, erreichen dann ein Plateau, das über mehrere Wochen konstant bleibt, und sinken im weiteren Verlauf wieder ab (69,118). *In vivo* beträgt der TEER von humanem RPE etwa $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (89).

Die in SMb kultivierten bRPE-Zellen zeigten über einen Zeitraum von 6 Wochen im Mittel ebenfalls diesen erwünschten Anstieg der Werte und unterschieden sich außer in Woche 1 nicht wesentlich von SMk-Kulturbedingungen. Bei TEER-Messwerten von über $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ab Woche 4 kann daher davon ausgegangen werden, dass die bRPE-Zellen prinzipiell eine intakte Barrierefunktion aufweisen.

5.2.2 Expression und Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und ZO-1

Generell konnten die Expression und Lokalisation aller untersuchten RPE-Marker-Proteine für die bRPE-Zellen gezeigt werden. Die in vorliegender Arbeit demonstrierte korrekte apikale Lokalisation der Natrium-Kalium-ATPase ist dabei als

charakteristisch für RPE-Zellen anzusehen (121–123). Durch die Aufrechterhaltung einer hohen Natrium-Konzentration im subretinalen Raum leistet sie bei RPE-Zellen einen maßgeblichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Phototransduktionskaskade (17,124,125). In den meisten anderen Epithelien ist die Natrium-Kalium-ATPase dagegen basolateral lokalisiert (121–123). Auch die gefundene basolaterale Lokalisation des Chloridkanals BEST1 ist spezifisch für RPE-Zellen (7,122). Zusätzlich spricht auch die korrekte Lokalisation des Transkriptionsfaktors OTX2 im Zellnukleus der bRPE-Zellen für eine erfolgreiche Differenzierung von RPE. So können RPE-Zellen während der frühen Augenentwicklung anhand der Genexpression von OTX2 und *MITF* molekular identifiziert werden (91,126,127). Weiterhin konnte die Bildung von Tight Junctions als eine essenzielle Funktion von RPE-Zellen zur Aufrechterhaltung der Blut-Netzhaut-Schranke (7,128) durch die Färbung der bRPE-Zellen gegen ZO-1 demonstriert werden. Diese steht im Einklang mit den hohen TEER-Messwerten der in SMb kultivierten, zuvor kryokonservierten bRPE-Zellen. Insgesamt konnte die immunzytochemische Färbung der bRPE-Zellen also deren RPE-Zell-Charakter auf Ebene der Proteinexpression weiter bestärken.

5.2.3 Phagozytose-Nachweis von porzinen POS

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten bRPE-Zelllinien die wichtige Schlüsselfunktion der POS-Phagozytose zeigen. Aufgrund des hohen Vorkommens von Rhodopsin in POS und gleichzeitig fehlender Expression von Rhodopsin in RPE-Zellen kann dessen Detektion mit der phagozytotischen Aktivität der RPE-Zellen direkt korreliert werden (129). Angelehnt an vorherige Studien wurden die RPE-Zellen mit der etablierten Konzentration von etwa 20 porzinen POS pro RPE-Zelle inkubiert (96,130–133). Eine 2-stündige Inkubation der Zellen hat sich am Institut für Humangenetik Regensburg und bei anderen Forschergruppen bewährt, um eine Internalisierung der POS in die RPE-Zellen zu gewährleisten (96,99,133,134) und wird daher als Aufnahmezeitpunkt (0 h) bezeichnet. Bei den kRPE-Zelllinien konnte zu keinem Zeitpunkt eine Rhodopsin-Färbung beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die bRPE-Zelllinien zum Zeitpunkt der Internalisierung (0 h) ein positives Signal, was auf eine erfolgreiche Aufnahme der POS durch die bRPE-Zellen hinweist. Die Proteinproben, die nach weiterer 4-stündiger Inkubation mit OptiMEM™ gewonnen wurden, zeigten die Degradation der

internalisierten POS durch die bRPE-Zellen durch das im Durchschnitt abgeschwächte oder fehlende Signal für die Färbung gegen Rhodopsin.

Die phagozytische Aktivität der kRPE-Zellen, die in veröffentlichten Studien bereits gezeigt wurde (68,69), konnte in vorliegender Arbeit nicht repliziert werden. Die im Vergleich zu den bRPE-Zellen schwächere Intensität der Beta-Aktin-Banden weist auf eine insgesamt geringere Proteinkonzentration in den kRPE-Proteinproben hin. Eine Wiederhohlung der Western-Blot-Analyse mit einer erhöhten Proteinmenge könnte möglicherweise die phagozytische Aktivität der kRPE-Zellen besser aufdecken.

Eine Studie von Aldmedawar et al. (135) bietet eine alternative Hypothese zur verminderten phagozytotischen Aktivität unserer kRPE-Zellen an. Die Autoren konnten zeigen, dass RPE-Zellen eine erhöhte phagozytische Aktivität aufwiesen, wenn dem aus hESC differenzierten RPE eine Stunde vor der Inkubation mit POS ein Zellkulturmedium mit 30 % Serum zugesetzt wurde. Ultrastrukturelle Analysen ergaben, dass die auch in Serum enthaltenen Liganden der mer Rezeptor Tyrosin-Kinase (MERTK), nämlich Growth arrest-specific Protein 6 und Protein S (136,137), MERTK und damit die Internalisierung von POS aktivieren (135). Während die bRPE-Zellen in vorliegender Arbeit in 10 % FBS kultiviert wurden, erhielten die kRPE-Zellen 5 % serumfreies KOSR. Analog zu der Studie von Almedawar et al. (135) könnten deshalb zusätzlich die fehlenden Liganden von MERTK in SMk zu einer fehlenden Internalisierung der POS durch die kRPE-Zellen beigetragen haben. Allerdings ist hier anzumerken, dass die beiden genannten Liganden von MERTK von RPE-Zellen auch selbst synthetisiert und an die Interphotorezeptormatrix abgegeben werden (136,138,139) und somit vermutlich auch im Medium der kRPE-Zellen in einer geringen Konzentration vorhanden waren. Wie später beschrieben, scheint vor allem die Kultivierung der bRPE-Zellen in SMro und der damit verbundene Entzug von Nicotinamid den unerwarteten Befund erklären zu können.

5.2.4 Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen

Prinzipiell demonstrierten alle bRPE-Zelllinien am 105. Tag der Differenzierung im Vergleich zu den iPS-Zellen eine signifikant hochregulierte Expression der RPE-Marker-Gene *BEST1*, *RPE65*, *PMEL* und *MITF*. Auch bei den bRPE- und kRPE-Zellen, die nach Kryokonservierung 6 Wochen auf Transwell-Filtern in Standardmedium kultiviert wurden, war die Genexpression von *RPE65* und *BEST1*

im Vergleich zu den iPS-Zellen signifikant erhöht und unterschied sich zudem nicht wesentlich zwischen den kRPE- und bRPE-Zellen. Damit konnte die erfolgreiche Gernerierung von RPE-Zellen durch das angepasste Protokoll für die Differenzierung von retinalen Organoiden auf Ebene der Genexpression bestätigt werden.

Die durchgängig signifikant niedrigere Expression der 4 Marker-Gene bei den bRPE-Zellen, die während ihrer Differenzierung kein Nicotinamid erhielten, bestätigt wiederum die wichtige Rolle von Nicotinamid für die Differenzierung von RPE.

Das gefundene Expressionsmuster der stark hochregulierten Expression von *RPE65* und *BEST1* im Vergleich zur niedrigeren Expression von *PMEL* und *MITF* könnte mit dem Entwicklungsgrad der Zelllinien zusammenhängen. So werden *BEST1* und *RPE65* als Marker für ausdifferenzierte RPE Zellen beschrieben (69,108), während *PMEL* und *MITF* eine wichtige Rolle für die frühe Differenzierung und Entwicklung der RPE-Zellen einnehmen (91,140). Limnios et al. (108) konnten in einer Studie zur Differenzierung von RPE aus hESC zeigen, dass die Expression von *MITF* und *PMEL* zwischen dem 10. und 14. Tag der Differenzierung stark hochreguliert wird. Eine Analyse der Zellreifung mittels qRT-PCR durch Vergleich der Genexpression am Tag 14 der Differenzierung und nach der 6. Zellpassage der RPE-Zellen konnte zudem deutliche Unterschiede hinsichtlich der Expression verschiedener RPE-Marker-Gene aufdecken. So zeigte sich bei den RPE-Zellen der 6. Passage im Vergleich zu Tag 14 unter anderem die Aufrechterhaltung der Expression von *MITF* und eine hochregulierte Expression von Genen, die für die Funktionalität des RPEs benötigt werden, wie *BEST1*, *RPE65* und *PMEL*. Dies würde bis auf die schwach hochregulierte Expression von *PMEL* auch das in vorliegender Arbeit entdeckte Genexpressionsmuster erklären. Konkrete Angaben darüber, welchen Tag der Differenzierung die RPE-Zellen der 6. Passage erreicht haben, finden sich in der Arbeit von Limnios et al. (108) leider nicht. Im Vergleich dazu wurden die am 105. Tag der Differenzierung untersuchten bRPE-Zellen zu diesem Zeitpunkt 2-malig passagiert. Wie in vorliegender Arbeit beschrieben, richtet sich der Zeitabstand von einer Zellpassage bis zur nächsten bei RPE-Zellen vor allem danach, wann die Zellen auf den Zellkulturplatten erneut Konfluenz erreichen und eine dichte, hexagonale Kopfsteinpflastermorphologie ausbilden. Dabei scheinen sich für verschiedene Forschergruppen je nach verwendetem Differenzierungsprotokoll etwas unterschiedliche Zeitabstände bewährt zu haben, die sich in einem Bereich von 28 bis 40 Tagen zwischen 2 Passagen bewegen (69,141–143). Geht man bei Limnios et

al (108) nun davon aus, dass die Zellen nach der 1. Passage am Tag 28 der Differenzierung regelmäßig alle 28 Tage passagiert wurden, haben die Zellen der 6. Passage mindestens den 168. Tag der Differenzierung erreicht. Die niedrigere Expression von *PMEL* könnte wiederum durch die in der vorliegenden Arbeit unpolare Kultivierung der bRPE-Zellen erklärt werden. So erlaubt die Kultivierung von RPE-Zellen auf Transwell-Filtern den Zellen durch Unterteilung des Systems in eine obere und untere Kammer ein polarisiertes Wachstum, das den Bedingungen *in vivo* näherkommt (118,144). Limnios et al. (108) machen jedoch auch keine Angaben zu den Kultivierungsbedingungen ihrer RPE-Zellen vor der Genexpressionsanalyse. Indirekt wird diese Theorie aber durch eine weitere Studie von Plaza Reyes et al. (145) bestätigt. So zeigte sich bei aus hESC differenzierten RPE-Zellen am 60. Tag der Differenzierung ein sehr ähnliches Genexpressionsmuster, wie es in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde: Während die Expression von *RPE65* im Vergleich zu den undifferenzierten hESC um etwa das 3500-fache und von *BEST1* um das 5000-fache erhöht war, war die Expression von *PMEL* lediglich um etwa das 40-fache und die von *MITF* um das 500-fache erhöht (145). Zwar sind diese Werte sicherlich nur begrenzt mit den Werten der bRPE-Zellen vergleichbar, die starke Ähnlichkeit des Genexpressionsmuster dieser vier Marker-Gene zu dem der bRPE-Zellen ist aber umso interessanter, da die RPE-Zellen in dieser Studie ebenfalls auf normalen Zellkulturplatten und damit unpolar kultiviert wurden. Natürlich muss berücksichtigt werden, dass nicht nur die Polarität der Zellen, sondern auch deren Entwicklungsgrad die Expression von *PMEL* entscheidend beeinflusst haben könnte. Mit Passage 6 bzw. mindestens dem 168. Tag der Differenzierung wurden bei Limnios et al. (108) schließlich deutlich weiter entwickelte RPE-Zellen analysiert, als dies bei Plaza Reyes et al. (145) am 60. Tag der Differenzierung und den hier untersuchten bRPE-Zellen am 105. Tag der Differenzierung der Fall war.

5.3 Einfluss der Kryokonservierung und der Zellkulturmedien auf die bRPE-Zellen

Mit dem Hauptziel einer künftigen Co-Kultur zwischen retinalen Organoiden und bRPE-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Toleranz der bRPE-Zellen von SMro über einen Zeitraum von 3 Wochen und deren Toleranz gegenüber einer Kryokonservierung untersucht.

Da die Differenzierung der bRPE-Zellen mit 91 Tagen zeitaufwändig ist und zusätzliche ressourcenintensive Materialen erfordert, ist es in Bezug auf eine spätere Co-Kultur mit den retinalen Organoiden entscheidend, dass diese auch nach einer Langzeitkonservierung in Flüssigstickstoff charakteristische Eigenschaften von RPE-Zellen bewahren. Die gleichzeitige Analyse der ZO1-Proteinexpression von kryokonservierten und nicht kryokonservierten bRPE-Zellen konnte zeigen, dass die Konservierung der Zellen in Flüssigstickstoff keinen Einfluss auf die Expression und Lokalisation von ZO-1 hatte. Die hohen TEER-Messwerte der kryokonservierten bRPE-Zellen sprechen ebenso für eine intakte Barrierefunktion der bRPE-Zellen. Zusätzlich konnte die Phagozytose von porzinen POS und die Expression der RPE-Marker-Gene *BEST1* und *RPE65* nach erfolgter Kryokonservierung der bRPE-Zellen gezeigt werden. Insgesamt spricht dies dafür, dass die Kryokonservierung keinen nennenswerten Einfluss auf die bRPE-Zellen ausübt.

Die Ergebnisse der Charakterisierung von bRPE-Zellen legen nahe, dass eine Kultivierung der bRPE-Zellen in SMk keinen wesentlichen Einfluss ausübt. So unterschied sich weder die Genexpression zwischen den in SMk oder SMb kultivierten bRPE-Zellen, noch konnte eine Veränderung in der Morphologie der Zellen durch Färbungen mit ZO-1 festgestellt werden. Eine Kultivierung der bRPE-Zellen in SMk scheint also grundsätzlich möglich. In Hinblick auf eine Co-Kultur mit retinalen Organoiden hat die Kultivierung der bRPE-Zellen in SMb jedoch den Vorteil, dass sich dieses in seiner Zusammensetzung nur in Hinblick auf den Zusatz von 0,5 µM ATRA und das Weglassen von Nicotinamid von SMro unterscheidet.

Die längerfristige Kultivierung der bRPE-Zellen in SMro über einen Zeitraum von 3 Wochen zeigte dagegen einen komplexen Einfluss auf die bRPE-Zellen. So fielen die TEER-Messwerte und die relative Genexpression von *BEST1* und *RPE65* ab, gleichzeitig zeigten die bRPE-Zellen aber eine Internalisierung und Degradation von porzinen POS. Die beobachteten Veränderungen der bRPE-Zellen könnten nun entweder durch den Zusatz von ATRA, den Entzug von Nicotinamid oder durch kombinatorische Wirkungen beider Faktoren zu erklären sein. Dadurch, dass RPE-Zellen im Gegensatz zu retinalen Organoiden im Allgemeinen kryokonserviert, anschließend wieder ausgesät und vermehrt werden können, ist es einfacher die Toleranz von SMro an bRPE-Zellen zu testen, anstatt den Einfluss von SMb auf die retinalen Organoide zu überprüfen. Hinzu kommt, dass sich die Zusammensetzung der verschiedenen Zelltypen der neuronalen Retina sowohl innerhalb eines

Organoids als auch zwischen verschiedenen retinalen Organoiden stark unterscheiden kann (55). Aufgrund der hohen Varianz zwischen den retinalen Organoiden müsste der Einfluss von SMB deshalb zeitaufwendig an einer sehr großen Anzahl von Organoiden getestet werden, um sinnvolle Schlüsse ziehen zu können.

Nicotinamid, das Amid der Nicotinsäure, besitzt - neben seiner Rolle bei der Differenzierung von RPE - eine biochemische Bedeutung im Zellstoffwechsel. Als Vorläufer der Koenzyme NAD⁺, NADP⁺ und anderer Substrate ist es an zentralen Stoffwechselwegen wie dem Citratzyklus und der mitochondrialen Atmungskette beteiligt (146). Es konnte gezeigt werden, dass Nicotinamid Zellen gegen oxidativen Stress schützt und die Mitochondrien gesund erhält (147,148).

ATRA ist ein aktiver Metabolit des Vitamin A Stoffwechsels, der im menschlichen Organismus eine entscheidende Rolle für die Differenzierung und Proliferation von Zellen spielt (149). Dabei fungiert ATRA als endogener Ligand für intranukleäre Retinsäure-Rezeptoren (*retinoic acid receptor*, RAR), welche nach Dimerisierung mit Retinoid-X-Rezeptoren wiederum an genregulatorische Bereiche der DNA binden (150–153). Auch die Embryonalentwicklung des Auges wird wesentlich durch ATRA gesteuert (154). Da das Vitamin-A-Derivat vor allem die Entwicklung der neuronalen Retina und im spezifischen die frühe embryonale Entwicklung der Photorezeptor-Stäbchen fördert (155–159), wird es auch regelmäßig zur Differenzierung von retinalen Organoiden eingesetzt (41,43,47,48,51). Im Säugerauge wird ATRA von verschiedenen Zelltypen wie zum Beispiel Amakrinzellen und Müller-Gliazellen synthetisiert (160,161). Zumindest postnatal geht die Bildung von ATRA aber vor allem von RPE-Zellen aus (162). Eine wichtige Funktion der Synthese von ATRA ist nach einer 2019 veröffentlichten Studie dabei die Verstoffwechslung eines anderen, relativ zytotoxischen Vitamin-A-Derivats, All-trans Retinal (163). Im Gegensatz zu All-trans Retinal können RPE-Zellen ATRA über ein Enzym der Cytochrom-P450-Familie katabolisieren (164). Zur Wirkung von ATRA auf RPE-Zellen ist die Literatur nicht eindeutig. Insgesamt wird eher eine inhibierende Wirkung von ATRA auf die Zellproliferation von RPE-Zellen angenommen (165–168). Kennedy et al. (169) konnten dagegen die hemmende Wirkung von ATRA auf das Zellwachstum von humanen RPE-Zellen nicht bestätigen. Yasunari et al. (170) beschreiben eine signifikant verstärkte Proliferation von bovinen RPE-Zellen durch Zusatz von ATRA in Konzentrationen zwischen 10 µM bis 25 µM. Sie beobachteten jedoch auch, dass

das Zellwachstum stagnierte, nachdem die RPE-Zellen Konfluenz erreichten. Dies wiederum bestätigt indirekt die Ergebnisse von Campochiaro et al. (171). Die Autoren beobachteten, dass 1 µM ATRA bei kultivierten humanen RPE-Zellen eine weitere Zellproliferation verhinderte, wenn die Zellen bereits ein konfluentes, einschichtiges Epithel gebildet hatten. Zusammenfassend konnte die inhibierende Wirkung von ATRA auf die Zellproliferation also unabhängig von verschiedenen Forschungsgruppen bestätigt werden. Dabei scheint es wahrscheinlich, dass dieser Effekt von ATRA von der Konfluenz der RPE-Zellen abhängt.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die TEER-Werte einen signifikanten Abfall der Messungen bei den bRPE-Zellen unmittelbar nach der Umstellung des Mediums auf SMro. In Kombination mit der Schrumpfung der bRPE-Zellen, aufgedeckt durch die ZO-1 Färbung, spricht dies für eine eingeschränkte Barrierefunktion der bRPE-Zellen. Rong und Liu (172) konnten einen konzentrationsabhängigen Einfluss von ATRA auf die Barrierefunktion von ARPE-19 Zellen zeigen. So kultivierten sie ARPE-19 Zellen über einen Zeitraum von 20 Tagen mit oder ohne Zusatz von ATRA, wobei alle 4 Tage TEER-Messwerte erhoben wurden. Innerhalb von 12 Tagen waren die TEER-Messwerte der RPE-Zellen, die mit Konzentrationen von 0,01 µM oder 0,1 µM kultiviert wurden, im Vergleich zu den Messwerten der RPE-Zellen, die ohne ATRA kultiviert wurden, signifikant erhöht. Dagegen fielen die TEER-Messwerte bei einer Konzentration von 1 µM ATRA nach 12 Tagen ab. Für die Autoren der Studie belegt dies einen zytotoxischen Effekt von ATRA in der Konzentration von 1 µM. Allerdings konnten in vielen anderen Studien keine zytotoxischen Effekte von ATRA auf RPE-Zellen bei einer Konzentration von 1 µM gefunden werden (165–168,173,174). Zwar scheint die Zytotoxizität von ATRA nicht endgültig geklärt, die Literatur und die erhaltene POS-Phagozytose-Fähigkeit der bRPE-Zellen sprechen jedoch eher gegen eine zytotoxische Wirkung von ATRA. Wahrscheinlicher beruhen die beobachteten Veränderungen der bRPE-Zellen auf dem Entzug von Nicotinamid. Diese Hypothese wird auch durch Boles et al. (175) unterstützt. So demonstrierten diese, dass die Morphologie des untersuchten adulten Stammzellen-RPE eher an Fibroblasten erinnerte und mehrschichtig erschien, wenn das verwendete Zellkulturmedium über einen Zeitraum von 30 Tagen kein Nicotinamid enthielt. Außerdem zeigte sich kein Anstieg der TEER-Messwerte, eine stark verminderte Proteinexpression von ZO-1 und eine signifikant verringerte Genexpression von *OTX2*, *RPE65* und *MITF* im Vergleich zu den mit Nicotinamid kultivierten Zellen. Die Autoren schließen daraus,

dass Nicotinamid RPE-Zellen vor einer epithelial-mesenchymalen Transition schützt. Während dieses Prozesses lösen sich die RPE-Zellen aus dem einschichtigen Epithel, proliferieren und nehmen mesenchymale Charakteristika an (175). Analog könnte in vorliegender Arbeit der Entzug von Nicotinamid eine epithelial-mesenchymale Transition der bRPE-Zellen ausgelöst haben. Dies würde den Abfall der TEER-Messwerte, die durch die ICC aufgedeckte veränderte Zellmorphologie und die verringerte Expression der RPE-Marker-Gene *RPE65* und *BEST1* der bRPE-Zellen erklären.

Gleichzeitig könnte ATRA auch einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation und Transition der bRPE-Zellen ausgeübt haben. Wie oben beschrieben, konnten Campochiaro et al. (171) bereits 1991 feststellen, dass die Kultivierung von RPE-Zellen mit 1 µM ATRA ein Überwachsen des einschichtigen Epithels verhinderte und die RPE-Zellen somit auch bei längerfristiger Kultur die charakteristischen morphologischen Eigenschaften von RPE-Zellen *in vivo* aufrecht erhielten. Eine Erklärung für diese Beobachtung liefert eine 2021 veröffentlichte Studie von Kobayashi et al. (176). Die Autoren demonstrierten, dass die gezielte Aktivierung einer der 3 spezifischen Isoformen des RAR, nämlich RAR- α , eine epithelial-mesenchymale Transformation von RPE verhindern konnte. Zusammenfassend spricht die Literatur also dafür, dass ATRA in der vorliegenden Arbeit ebenfalls über RAR- α einen hemmenden Effekt auf die durch Nicotinamidentzug ausgelöste Transformation der bRPE-Zellen gehabt haben könnte.

Die gezeigte durchgängige Internalisierung und Degradation der POS bei den bRPE-Zellen könnte zum Teil ebenso durch den Entzug von Nicotinamid erklärt werden. So ist es am Institut für Humangenetik und bei anderen Forschergruppen bekannt, dass RPE-Zellen eine verstärkte Bindung von POS an ihrer Zellmembran demonstrieren, wenn sie ohne Nicotinamid kultiviert werden (100). Allerdings beobachteten Hazim et al. (100) gleichzeitig, dass mit Nicotinamid kultivierte ARPE-19 Zellen trotz einer geringeren Bindekapazität von POS eine höhere Internalisierung und schnellere Degradation zeigten, als die Zellen, die ohne Nicotinamid kultiviert wurden. Denkbar wäre deshalb, dass sich zusätzlich die Expression von Genen zur Verstoffwechslung von ATRA und anderen Vitamin-A-Derivaten in den bRPE-Zellen verstärkt hat, um den Stoffwechsel auf den konstanten Zusatz von ATRA einzustellen. Da die Degradation von POS ebenso die Verstoffwechslung von Vitamin-A-Derivaten erfordert (177), könnten die bRPE-Zellen durch ihre 3-wöchige Kultivierung mit ATRA

auf die schnelle Internalisierung und Degradation von POS bereits optimal vorbereitet gewesen sein.

Unabhängig davon, ob der Entzug von Nicotinamid, der Zusatz von ATRA oder eine Kombination beider Bedingungen den Einfluss von SMro auf die bRPE-Zellen verursacht hat, sind die Befunde der vorliegenden Studie in Hinblick auf die geplante Co-Kultur mit retinalen Organoiden problematisch. So kann aufgrund einer eingeschränkten Barrierefunktion und signifikant verminderter Genexpression von *RPE65* nicht garantiert werden, dass das bRPE seine physiologische Funktion während der Co-Kultur weiter erfüllt. Daher wäre es zunächst sinnvoll zu überprüfen, wie lange die bRPE-Zellen in der Lage sind SMro zu tolerieren, ohne dass sich bemerkbare Veränderungen hinsichtlich der Barrierefunktion oder mRNA-Expression einstellen. Außerdem könnte eine weitere Versuchsreihe klären, ob die bRPE-Zellen eine langsamere oder schnellere Gewöhnung an SMro besser tolerieren würden. So könnte die Zeit der Umstellung des Mediums von SMb zu SMro über ein paar Tage bis hin zu ein paar Wochen variiert werden. Als Alternative zu Nicotinamid könnte dem gemeinsamen Zellkulturmedium während der Co-Kultur auch Nicotinamid-Mononukleotid (NMN) zugesetzt werden. Es hat sich gezeigt, dass NMN den Alterungsprozess von RPE-Zellen aufhalten kann (178) und nach einer Netzhautablösung neuroprotektiv auf Photorezeptoren wirkt (179). Damit könnten durch den Zusatz von NMN, die vermutlich durch den Entzug von Nicotinamid ausgelösten Veränderungen der bRPE-Zellen eventuell verhindert werden, ohne dass ein negativer Effekt auf die sensiblen retinalen Organoide zu erwarten wäre.

6. Zusammenfassung

Aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen ausdifferenzierte retinale Organoide bilden die neuronale Retina in wichtigen Bereichen in ihrer typischen Schichtung ab. Das retinale Pigmentepithel (RPE) wird in den bestehenden Differenzierungsprotokollen für retinale Organoide jedoch lediglich ektopisch als kugelförmige, mehrschichtige Struktur ausgebildet. Sowohl die Reifung als auch die Funktionalität der neuronalen Retina wird *in vivo* aber entscheidend vom direkten Kontakt des RPE zu den Photorezeptoraußensegmenten beeinflusst. Die Rekonstruktion der wichtigen physiologischen Beziehung zwischen RPE und

Photorezeptoren *in vitro* wäre deshalb der nächste Schritt, um ein präziseres Modell der Netzhaut für die Forschung zu etablieren.

Am Institut für Humangenetik Regensburg wurde das existierende Differenzierungsprotokoll für retinale Organoide so angepasst, dass zusätzlich zu den retinalen Organoiden als Nebenprodukt RPE (bRPE) gewonnen werden kann. Die gleichzeitige Ausdifferenzierung von bRPE und retinalen Organoiden über ein einziges Protokoll spart erheblich Ressourcen und Zeit, es garantiert aber auch eine identische epigenetische Herkunft der verschiedenen Zelltypen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Reproduzierbarkeit dieses Protokolls überprüft werden. Durch eine fungale Kontamination von 4 der 5 bRPE-Zelldifferenzierungen konnte dies allerdings nur begrenzt bestätigt werden.

Im zweiten Teil sollten die in einer Vorarbeit bereits differenzierten bRPE-Zellen näher charakterisiert werden. Dazu wurde für diese Zellen die Expression von verschiedenen RPE-Marker-Genen mithilfe der qRT-PCR Analyse und die Proteinexpression mithilfe der Immunzytochemie untersucht. Weiterhin wurde der transepitheliale elektrische Widerstand und die Fähigkeit zur Phagozytose von Photorezeptor-Außensegmenten bestimmt. In allen durchgeführten Experimenten zeigten die bRPE-Zellen charakteristische Eigenschaften von RPE-Zellen, jedoch mit einer hohen Variabilität zwischen den einzelnen bRPE-Differenzierungen.

In Hinblick auf eine spätere Co-Kultur der retinalen Organoide mit den bRPE-Zellen wurde im dritten Teil der Arbeit der Einfluss des Mediums der retinalen Organoide auf die bRPE-Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass die Kultivierung der bRPE-Zellen im Medium für die retinalen Organoide über 3 Wochen einen signifikanten Abfall der TEER-Messwerte und eine signifikant verringerte Expression des RPE-Marker-Gens *RPE65* verursachte. Die Kultivierung der bRPE-Zellen im Standardmedium nach Krohne et al. (2012) und eine vorangegangene Kryokonservierung schienen dagegen keinen Einfluss auf die Eigenschaften der bRPE-Zellen zu nehmen. Um bei einer Co-Kultur ein möglichst physiologisches bRPE garantieren zu können, sollte in künftigen weiteren Studien überprüft werden, ob eine schnellere oder langsamere Umstellung der bRPE-Zellen auf das Medium der retinalen Organoide oder alternativ der Zusatz von Nicotinamid-Mononukleotid eine positive oder negative Auswirkung auf die bRPE-Zellen zeigt.

7. Literaturverzeichnis

1. Fathi M, Ross CT, Hosseinzadeh Z. Functional 3-Dimensional Retinal Organoids: Technological Progress and Existing Challenges. *Front Neurosci.* 2021;15:668857. doi:10.3389/fnins.2021.668857 Cited in: PubMed; PMID 33958988.
2. Artero Castro A, Rodríguez Jimenez FJ, Jendelova P, Erceg S. Deciphering retinal diseases through the generation of three dimensional stem cell-derived organoids: Concise Review. *Stem Cells.* 2019;37(12):1496–504. doi:10.1002/stem.3089 Cited in: PubMed; PMID 31617949.
3. Leach LL, Clegg DO. Concise Review: Making Stem Cells Retinal: Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease. *Stem Cells.* 2015;33(8):2363–73. doi:10.1002/stem.2010 Cited in: PubMed; PMID 25809736.
4. Singh RK, Nasonkin IO. Limitations and Promise of Retinal Tissue From Human Pluripotent Stem Cells for Developing Therapies of Blindness. *Front Cell Neurosci.* 2020;14:179. doi:10.3389/fncel.2020.00179 Cited in: PubMed; PMID 33132839.
5. World Health Organization. World report on vision [Internet]. Geneva. 2019 [cited 2021 Sep 14]; [180 p.]. Available from: <https://www.iapb.org/learn/resources/the-world-report-on-vision/>
6. Seah I, Goh D, Banerjee A, Su X. Modeling inherited retinal diseases using human induced pluripotent stem cell derived photoreceptor cells and retinal pigment epithelial cells. *Front Med (Lausanne).* 2024;11:1328474. doi:10.3389/fmed.2024.1328474 Cited in: PubMed; PMID 39011458.
7. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev.* 2005;85(3):845–81. doi:10.1152/physrev.00021.2004 Cited in: PubMed; PMID 15987797.
8. Jin Z-B, Gao M-L, Deng W-L, Wu K-C, Sugita S, Mandai M, Takahashi M. Stemming retinal regeneration with pluripotent stem cells. *Prog Retin Eye Res.* 2019;69:38–56. doi:10.1016/j.preteyeres.2018.11.003 Cited in: PubMed; PMID 30419340.

9. Ali RR, Sowden JC. Regenerative medicine: DIY eye. *Nature*. 2011;472(7341):42–3. doi:10.1038/472042a Cited in: PubMed; PMID 21475187.
10. O'Rahilly R. The prenatal development of the human eye. *Experimental Eye Research*. 1975;21(2):93–112. doi:10.1016/0014-4835(75)90075-5
11. Sheedlo HJ, Nelson TH, Lin N, Rogers TA, Roque RS, Turner JE. RPE secreted proteins and antibody influence photoreceptor cell survival and maturation. *Developmental Brain Research*. 1998;107(1):57–69. doi:10.1016/S0165-3806(97)00219-8
12. Sheedlo HJ, Turner JE. Effects of retinal pigment epithelial cell-secreted factors on neonatal rat retinal explant progenitor cells. *J. Neurosci. Res.* 1996;44(6):519–31. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19960615)44:6<519:AID-JNR2>3.0.CO;2-E
13. Sheedlo HJ, Turner JE. Immunocytochemical characterisation of proteins secreted by retinal pigment epithelium in retinas of normal and Royal College of Surgeons dystrophic rats. *J Anat*. 1998;193 (Pt 2):223–32. doi:10.1046/j.1469-7580.1998.19320223.x Cited in: PubMed; PMID 9827638.
14. Sheedlo HJ, Turner JE. Influence of a retinal pigment epithelial cell factor(s) on rat retinal progenitor cells. *Developmental Brain Research*. 1996;93(1-2):88–99. doi:10.1016/0165-3806(96)00008-9
15. Rizzolo LJ, Zhou S, Li ZQ. The neural retina maintains integrins in the apical membrane of the RPE early in development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994;35(5):2567–76. Available from:
<https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2161104>
16. Boulton ME. Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Experimental Eye Research*. 2014;12661–7. doi:10.1016/j.exer.2014.01.016 Cited in: PubMed; PMID 25152361.
17. Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E. Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Experimental Eye Research*. 2014;1265–15. doi:10.1016/j.exer.2014.04.021 Cited in: PubMed; PMID 25152359.

18. Rizzolo LJ. RPE Polarity and Barrier Function. In: Klettner AK, Dithmar S, editors. *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. Cham: Springer International Publishing; 2020; 19–45.
19. Ji C, Li Y, Kittredge A, Hopiavuori A, Ward N, Yao P, Fukuda Y, Zhang Y, Tsang SH, Yang T. Investigation and Restoration of BEST1 Activity in Patient-derived RPEs with Dominant Mutations. *Sci Rep*. 2019;9(1):19026. doi:10.1038/s41598-019-54892-7 Cited in: PubMed; PMID 31836750.
20. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*. 1986;103(3):755–66. doi:10.1083/jcb.103.3.755 Cited in: PubMed; PMID 3528172.
21. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3–10. doi:10.1159/000345615 Cited in: PubMed; PMID 23257690.
22. Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature*. 2006;441(7097):1060. doi:10.1038/nature04954
23. Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001;19(6):477–82. doi:10.1634/stemcells.19-6-477 Cited in: PubMed; PMID 11713338.
24. Miguel MP de, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep*. 2010;6(4):633–49. doi:10.1007/s12015-010-9170-1 Cited in: PubMed; PMID 20669057.
25. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145–7. doi:10.1126/science.282.5391.1145 Cited in: PubMed; PMID 9804556.
26. Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S. Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(18):6907–12. doi:10.1073/pnas.0602280103 Cited in: PubMed; PMID 16632596.

27. Little M, Hall W, Orlandi A. Delivering on the promise of human stem-cell research. What are the real barriers? *EMBO Rep.* 2006;7(12):1188–92. doi:10.1038/sj.embor.7400861 Cited in: PubMed; PMID 17139291.
28. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 Cited in: PubMed; PMID 16904174.
29. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007;448(7151):313–7. doi:10.1038/nature05934 Cited in: PubMed; PMID 17554338.
30. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science.* 2007;318(5858):1917–20. doi:10.1126/science.1151526 Cited in: PubMed; PMID 18029452.
31. Park I-H, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008;451(7175):141–6. doi:10.1038/nature06534 Cited in: PubMed; PMID 18157115.
32. Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, Young RA. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(2):249–57. doi:10.1016/j.stem.2010.06.015 Cited in: PubMed; PMID 20682450.
33. Newman AM, Cooper JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(2):258–62. doi:10.1016/j.stem.2010.06.016 Cited in: PubMed; PMID 20682451.
34. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LIR, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.*

- 2010;467(7313):285–90. doi:10.1038/nature09342 Cited in: PubMed; PMID 20644535.
35. Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):541–9.
doi:10.1038/ncb2239 Cited in: PubMed; PMID 21499256.
 36. Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):68–73. doi:10.1038/nature09798. Cited in: PubMed; PMID 21289626.
 37. Young MA, Larson DE, Sun C-W, George DR, Ding L, Miller CA, Lin L, Pawlik KM, Chen K, Fan X, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Cook LL, Swift GW, Demeter RT, Wendl MC, Sands MS, Mardis ER, Wilson RK, Townes TM, Ley TJ. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(5):570–82. doi:10.1016/j.stem.2012.03.002 Cited in: PubMed; PMID 22542160.
 38. Pressemitteilung zum Nobelpreis für Medizin 2012 NobelPrize.org. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012 [Internet]. 2021 [updated 2025 Mar 11; cited 2021 Oct 4]. Available from: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/press-release/>
 39. Jin Z-B, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*. 2011;6(2):e17084.
doi:10.1371/journal.pone.0017084 Cited in: PubMed; PMID 21347327.
 40. Jin Z-B, Okamoto S, Xiang P, Takahashi M. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from retinitis pigmentosa patient for disease modeling. *Stem Cells Transl Med*. 2012;1(6):503–9. doi:10.5966/sctm.2012-0005 Cited in: PubMed; PMID 23197854.
 41. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, Sekiguchi K, Adachi T, Sasai Y. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-

- dimensional culture. *Nature*. 2011;472(7341):51–6. doi:10.1038/nature09941 Cited in: PubMed; PMID 21475194.
42. Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pinilla I, Martin JM, Tian S, Stewart R, Pattnaik B, Thomson JA, Gamm DM. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells*. 2011;29(8):1206–18. doi:10.1002/stem.674 Cited in: PubMed; PMID 21678528.
43. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*. 2012;10(6):771–85. doi:10.1016/j.stem.2012.05.009 Cited in: PubMed; PMID 22704518.
44. Singh RK, Mallela RK, Cornuet PK, Reifler AN, Chervenak AP, West MD, Wong KY, Nasonkin IO. Characterization of Three-Dimensional Retinal Tissue Derived from Human Embryonic Stem Cells in Adherent Monolayer Cultures. *Stem Cells Dev*. 2015;24(23):2778–95. doi:10.1089/scd.2015.0144 Cited in: PubMed; PMID 26283078.
45. Mellough CB, Collin J, Khazim M, White K, Sernagor E, Steel DHW, Lako M. IGF-1 Signaling Plays an Important Role in the Formation of Three-Dimensional Laminated Neural Retina and Other Ocular Structures From Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2015;33(8):2416–30. doi:10.1002/stem.2023 Cited in: PubMed; PMID 25827910.
46. Lowe A, Harris R, Bhansali P, Cvekl A, Liu W. Intercellular Adhesion-Dependent Cell Survival and ROCK-Regulated Actomyosin-Driven Forces Mediate Self-Formation of a Retinal Organoid. *Stem Cell Reports*. 2016;6(5):743–56. doi:10.1016/j.stemcr.2016.03.011 Cited in: PubMed; PMID 27132890.
47. Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao L-H, Peters A, Park TS, Zambidis ET, Meyer JS, Gamm DM, Yau K-W, Canto-Soler MV. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*. 2014;5(1):4047. doi:10.1038/ncomms5047 Cited in: PubMed; PMID 24915161.
48. Wahlin KJ, Maruotti JA, Sripathi SR, Ball J, Angueyra JM, Kim C, Grebe R, Li W, Jones BW, Zack DJ. Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-

- Term 3D Retinas from Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep.* 2017;7(1):766. doi:10.1038/s41598-017-00774-9 Cited in: PubMed; PMID 28396597.
49. Ghareeb AE, Lako M, Steel DH. Coculture techniques for modeling retinal development and disease, and enabling regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 2020;9(12):1531–48. doi:10.1002/sctm.20-0201 Cited in: PubMed; PMID 32767661.
50. O'Hara-Wright M, Gonzalez-Cordero A. Retinal organoids: a window into human retinal development. *Development.* 2020;147(24). doi:10.1242/dev.189746 Cited in: PubMed; PMID 33361444.
51. Capowski EE, Samimi K, Mayerl SJ, Phillips MJ, Pinilla I, Howden SE, Saha J, Jansen AD, Edwards KL, Jager LD, Barlow K, Valiauga R, Erlichman Z, Hagstrom A, Sinha D, Sluch VM, Chamling X, Zack DJ, Skala MC, Gamm DM. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development.* 2019;146(1). doi:10.1242/dev.171686 Cited in: PubMed; PMID 30567931.
52. Gonzalez-Cordero A, Kruczak K, Naeem A, Fernando M, Kloc M, Ribeiro J, Goh D, Duran Y, Blackford SJI, Abelleira-Hervas L, Sampson RD, Shum IO, Branch MJ, Gardner PJ, Sowden JC, Bainbridge JWB, Smith AJ, West EL, Pearson RA, Ali RR. Recapitulation of Human Retinal Development from Human Pluripotent Stem Cells Generates Transplantable Populations of Cone Photoreceptors. *Stem Cell Reports.* 2017;9(3):820–37. doi:10.1016/j.stemcr.2017.07.022 Cited in: PubMed; PMID 28844659.
53. Ovando-Roche P, West EL, Branch MJ, Sampson RD, Fernando M, Munro P, Georgiadis A, Rizzi M, Kloc M, Naeem A, Ribeiro J, Smith AJ, Gonzalez-Cordero A, Ali RR. Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):156. doi:10.1186/s13287-018-0907-0 Cited in: PubMed; PMID 29895313.
54. Heidelberger R, Thoreson WB, Witkovsky P. Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Prog Retin Eye Res.* 2005;24(6):682–720. doi:10.1016/j.preteyeres.2005.04.002 Cited in: PubMed; PMID 16027025.
55. Hallam D, Hilgen G, Dorgau B, Zhu L, Yu M, Bojic S, Hewitt P, Schmitt M, Uteng M, Kustermann S, Steel D, Nicholds M, Thomas R, Treumann A, Porter A, Sernagor E, Armstrong L, Lako M. Human-Induced Pluripotent Stem Cells

- Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency. *Stem Cells*. 2018;36(10):1535–51. doi:10.1002/stem.2883 Cited in: PubMed; PMID 30004612.
56. Cowan CS, Renner M, Gennaro M de, Gross-Scherf B, Goldblum D, Hou Y, Munz M, Rodrigues TM, Krol J, Szikra T, Cuttat R, Waldt A, Papasaikas P, Diggelmann R, Patino-Alvarez CP, Galliker P, Spirig SE, Pavlinic D, Gerber-Hollbach N, Schuierer S, Srđanović A, Balogh M, Panero R, Kusnyerik A, Szabo A, Stadler MB, Orgül S, Picelli S, Hasler PW, Hierlemann A, Scholl HPN, Roma G, Nigsch F, Roska B. Cell Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. *Cell*. 2020;182(6):1623-1640.e34. doi:10.1016/j.cell.2020.08.013 Cited in: PubMed; PMID 32946783.
57. Afanasyeva TAV, Corral-Serrano JC, Garanto A, Roepman R, Cheetham ME, Collin RWJ. A look into retinal organoids: methods, analytical techniques, and applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 2021;1–28. doi:10.1007/s00018-021-03917-4 Cited in: PubMed; PMID 34420069.
58. Fligor CM, Lavekar SS, Harkin J, Shields PK, VanderWall KB, Huang K-C, Gomes C, Meyer JS. Extension of retinofugal projections in an assembled model of human pluripotent stem cell-derived organoids. *Stem Cell Reports*. 2021;16(9):2228–41. doi:10.1016/j.stemcr.2021.05.009 Cited in: PubMed; PMID 34115986.
59. Achberger K, Haderspeck JC, Kleger A, Liebau S. Stem cell-based retina models. *Adv Drug Deliv Rev*. 2019;14033–50. doi:10.1016/j.addr.2018.05.005 Cited in: PubMed; PMID 29777757.
60. Watson A, Lako M. Retinal organoids provide unique insights into molecular signatures of inherited retinal disease throughout retinogenesis. *J Anat*. 2023;243(2):186–203. doi:10.1111/joa.13768 Cited in: PubMed; PMID 36177499.
61. Hendrickson A, Possin D, Vajzovic L, Toth CA. Histologic development of the human fovea from midgestation to maturity. *Am J Ophthalmol*. 2012;154(5):767–778.e2. doi:10.1016/j.ajo.2012.05.007 Cited in: PubMed; PMID 22935600.
62. Kurzawa-Akanbi M, Tzoumas N, Corral-Serrano JC, Guarascio R, Steel DH, Cheetham ME, Armstrong L, Lako M. Pluripotent stem cell-derived models of retinal disease: Elucidating pathogenesis, evaluating novel treatments, and

- estimating toxicity. *Prog Retin Eye Res.* 2024;100101248. doi:10.1016/j.preteyeres.2024.101248 Cited in: PubMed; PMID 38369182.
63. Akhtar T, Xie H, Khan MI, Zhao H, Bao J, Zhang M, Xue T. Accelerated photoreceptor differentiation of hiPSC-derived retinal organoids by contact co-culture with retinal pigment epithelium. *Stem Cell Res.* 2019;39101491. doi:10.1016/j.scr.2019.101491 Cited in: PubMed; PMID 31326746.
64. Achberger K, Probst C, Haderspeck J, Bolz S, Rogal J, Chuchuy J, Nikolova M, Cora V, Antkowiak L, Haq W, Shen N, Schenke-Layland K, Ueffing M, Liebau S, Loskill P. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform. *eLife.* 2019;8. doi:10.7554/eLife.46188 Cited in: PubMed; PMID 31451149.
65. Su T, Liang L, Zhang L, Wang J, Chen L, Su C, Cao J, Yu Q, Deng S, Chan HF, Tang S, Guo Y, Chen J. Retinal organoids and microfluidic chip-based approaches to explore the retinitis pigmentosa with USH2A mutations. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022;10939774. doi:10.3389/fbioe.2022.939774 Cited in: PubMed; PMID 36185441.
66. Berber P, Bondarenko S, Michaelis L, Weber BHF. Transient Retention of Photoreceptor Outer Segments in Matrigel-Embedded Retinal Organoids. *Int J Mol Sci.* 2022;23(23). doi:10.3390/ijms232314893 Cited in: PubMed; PMID 36499228.
67. Bondarenko S. Generation of Retinal Organoid-Retinal Pigment Epithelium Cocultures: Universität Regensburg; 2024.
68. Krohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, Li W, Zhu S, Schultz A, Wang J, Siuzdak G, Ding S, Friedlander M. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(2):96–109. doi:10.5966/sctm.2011-0057 Cited in: PubMed; PMID 22532929.
69. Brandl C, Zimmermann SJ, Milenkovic VM, Rosendahl SMG, Grassmann F, Milenkovic A, Hehr U, Federlin M, Wetzel CH, Helbig H, Weber BHF. In-depth characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *Neuromolecular Med.* 2014;16(3):551–64. doi:10.1007/s12017-014-8308-8 Cited in: PubMed; PMID 24801942.

70. Brandl C, Grassmann F, Riolfi J, Weber BHF. Tapping Stem Cells to Target AMD: Challenges and Prospects. *J Clin Med.* 2015;4(2):282–303.
doi:10.3390/jcm4020282 Cited in: PubMed; PMID 26239128.
71. Nachtigal A-L, Milenkovic A, Brandl C, Schulz HL, Duerr LMJ, Lang GE, Reiff C, Herrmann P, Kellner U, Weber BHF. Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. *Int J Mol Sci.* 2020;21(5).
doi:10.3390/ijms21051597 Cited in: PubMed; PMID 32111077.
72. Berber P, Milenkovic A, Michaelis L, Weber BHF. Retinal organoid differentiation methods determine organoid cellular composition. *jtgg.* 2021.
doi:10.20517/jtgg.2021.35
73. Brandl C. Generation of Functional Retinal Pigment Epithelium from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 2019;1834:87–94.
doi:10.1007/978-1-4939-8669-9_6 Cited in: PubMed; PMID 30324438.
74. Hu Q, Friedrich AM, Johnson LV, Clegg DO. Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells.* 2010;28(11):1981–91.
doi:10.1002/stem.531 Cited in: PubMed; PMID 20882530.
75. Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, Clegg DO. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009;27(10):2427–34. doi:10.1002/stem.189
Cited in: PubMed; PMID 19658190.
76. PureLink RNA Mini Kit [Internet]; [5 p.]. Available from:
https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0019346_RNA_Mini_animal_tissue_QR.pdf?_ga=2.5165474.868610998.1629712267-1744480721.1628087655
77. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262 Cited in: PubMed; PMID 11846609.
78. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 1965;52(3-4):591–611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591

79. Razali NM, Wah YB. Power comparison of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*. 2011;2(1):21–33.
80. Levene H. Robust Tests for Equality of Variances. In: Olkin I, editor. *Contributions to Probability and Statistics*. Palo Alto: Standford University Press; 1960. p. 278–92.
81. Fisher RA. Statistical Methods for Research Workers. In: Kotz S, editor. *Breakthroughs in Statistics, Methodology and Distribution*. New York, NY: Springer New York; 1992. p. 66–70. (Springer Series in Statistics Ser). Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-4380-9_6
82. Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2nd ed. Hoboken: Taylor and Francis; 1988. 567 p. eng.
83. Welch BL. The Significance of the Difference Between Two Means when the Population Variances are Unequal. *Biometrika*. 1938;29(3/4):350. doi:10.2307/2332010
84. Games PA, Howell JF. Pairwise Multiple Comparison Procedures with Unequal N's and/or Variances: A Monte Carlo Study. *Journal of Educational Statistics*. 1976;1(2):113–25. doi:10.2307/1164979
85. Kruskal WH, Wallis WA. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*. 1952;47(260):583–621. doi:10.1080/01621459.1952.10483441
86. Dunn OJ. Multiple Comparisons among Means. *Journal of the American Statistical Association*. 1961;56(293):52–64. doi:10.1080/01621459.1961.10482090
87. Dinno A. Nonparametric Pairwise Multiple Comparisons in Independent Groups using Dunn's Test. *The Stata Journal*. 2015;15(1):292–300. doi:10.1177/1536867X1501500117
88. Cohen J. A power primer. *Psychological Bulletin*. 1992;112(1):155–9. doi:10.1037//0033-2909.112.1.155 Cited in: PubMed; PMID 19565683.

89. Quinn RH, Miller SS. Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(13):3513–27. Cited in: PubMed; PMID 1334477.
90. Cao L, Liu J, Pu J, Milne G, Chen M, Xu H, Shipley A, Forrester JV, McCaig CD, Lois N. Polarized retinal pigment epithelium generates electrical signals that diminish with age and regulate retinal pathology. *J Cell Mol Med.* 2018;22(11):5552–64. doi:10.1111/jcmm.13829 Cited in: PubMed; PMID 30160348.
91. Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S. OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *Journal of Biological Chemistry.* 2003;278(24):21721–31. doi:10.1074/jbc.M301708200 Cited in: PubMed; PMID 12663655.
92. Nishihara D, Yajima I, Tabata H, Nakai M, Tsukiji N, Katahira T, Takeda K, Shibahara S, Nakamura H, Yamamoto H. Otx2 is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of sox2 and fgf8, factors that induce neural retina differentiation. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e48879. doi:10.1371/journal.pone.0048879 Cited in: PubMed; PMID 23145006.
93. Mirjalili A, Parmoor E, Moradi Bidhendi S, Sarkari B. Microbial contamination of cell cultures: a 2 years study. *Biologicals.* 2005;33(2):81–5. doi:10.1016/j.biologicals.2005.01.004 Cited in: PubMed; PMID 15939285.
94. Ali S. Microbial and Viral Contamination of Animal and Stem Cell Cultures: Common Contaminants, Detection and Elimination. *JSRT.* 2017;2(5). doi:10.15406/JSRT.2017.02.00078
95. Martinez LR, Ntiamoah P, Casadevall A, Nosanchuk JD. Caspofungin reduces the incidence of fungal contamination in cell culture. *Mycopathologia.* 2007;164(6):279–86. doi:10.1007/s11046-007-9063-2 Cited in: PubMed; PMID 17899440.
96. Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer J, Martin JM, Smith MA, Perez ET, Shen W, Wallace KA, Capowski EE, Wright LS, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(10):6767–78. doi:10.1167/iovs.13-11943 Cited in: PubMed; PMID 24030465.

97. Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, Khaner H, Smith Y, Wiser O, Gropp M, Cohen MA, Even-Ram S, Berman-Zaken Y, Matzrafi L, Rechavi G, Banin E, Reubinoff B. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell.* 2009;5(4):396–408. doi:10.1016/j.stem.2009.07.002 Cited in: PubMed; PMID 19796620.
98. Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(5):384–93. doi:10.5966/sctm.2012-0163 Cited in: PubMed; PMID 23599499.
99. Hazim RA, Karumbayaram S, Jiang M, Dimashkie A, Lopes VS, Li D, Burgess BL, Vijayaraj P, Alva-Ornelas JA, Zack JA, Kohn DB, Gomperts BN, Pyle AD, Lowry WE, Williams DS. Differentiation of RPE cells from integration-free iPS cells and their cell biological characterization. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):217. doi:10.1186/s13287-017-0652-9 Cited in: PubMed; PMID 28969679.
100. Hazim RA, Volland S, Yen A, Burgess BL, Williams DS. Rapid differentiation of the human RPE cell line, ARPE-19, induced by nicotinamide. *Experimental Eye Research.* 2019;179:18–24. doi:10.1016/j.exer.2018.10.009 Cited in: PubMed; PMID 30336127.
101. Maruotti J, Sripathi SR, Bharti K, Fuller J, Wahlin KJ, Ranganathan V, Sluch VM, Berlinicke CA, Davis J, Kim C, Zhao L, Wan J, Qian J, Corneo B, Temple S, Dubey R, Olenyuk BZ, Bhutto I, Lutty GA, Zack DJ. Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(35):10950–5. doi:10.1073/pnas.1422818112 Cited in: PubMed; PMID 26269569.
102. Ye K, Takemoto Y, Ito A, Onda M, Morimoto N, Mandai M, Takahashi M, Kato R, Osakada F. Reproducible production and image-based quality evaluation of retinal pigment epithelium sheets from human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):14387. doi:10.1038/s41598-020-70979-y Cited in: PubMed; PMID 32873827.

103. Liang G, Zhang Y. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell.* 2013;13(2):149–59. doi:10.1016/j.stem.2013.07.001 Cited in: PubMed; PMID 23910082.
104. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(1):7–16. doi:10.1007/s12015-016-9680-6 Cited in: PubMed; PMID 27592701.
105. Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti J-C, Yakir B, Clark AT, Plath K, Lowry WE, Benvenisty N. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010;7(4):521–31. doi:10.1016/j.stem.2010.07.017 Cited in: PubMed; PMID 20887957.
106. Vaz IM, Borgonovo T, Kasai-Brunswick TH, Santos DSD, Mesquita FCP, Vasques JF, Gubert F, Rebelatto CLK, Senegaglia AC, Brofman PRS. Chromosomal aberrations after induced pluripotent stem cells reprogramming. *Genet Mol Biol.* 2021;44(3):e20200147. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2020-0147 Cited in: PubMed; PMID 34496008.
107. Konagaya S, Ando T, Yamauchi T, Suemori H, Iwata H. Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system. *Sci Rep.* 2015;5(1):16647. doi:10.1038/srep16647 Cited in: PubMed; PMID 26573336.
108. Limnios IJ, Chau Y-Q, Skabo SJ, Surrao DC, O'Neill HC. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to retinal pigment epithelium under defined conditions. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):248. doi:10.1186/s13287-021-02316-7 Cited in: PubMed; PMID 33883023.
109. Regent F, Morizur L, Lesueur L, Habeler W, Plancheron A, Ben M'Barek K, Monville C. Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions. *Sci Rep.* 2019;9(1):10646. doi:10.1038/s41598-019-47123-6 Cited in: PubMed; PMID 31337830.
110. Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, Lowenstein SE, Clegg DO. Canonical/β-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*

2015;56(2):1002–13. doi:10.1167/iovs.14-15835 Cited in: PubMed; PMID 25604686.

111. Foltz LP, Clegg DO. Rapid, Directed Differentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Human Embryonic or Induced Pluripotent Stem Cells. *J Vis Exp.* 2017;(128). doi:10.3791/56274 Cited in: PubMed; PMID 29155780.
112. Regha K, Bhargava M, Al-Mubaarak A, Chai C, Parikh BH, Liu Z, Wong CSW, Hunziker W, Lim KL, Su X. Customized strategies for high-yield purification of retinal pigment epithelial cells differentiated from different stem cell sources. *Sci Rep.* 2022;12(1):15563. doi:10.1038/s41598-022-19777-2 Cited in: PubMed; PMID 36114268.
113. Kellner G, Broda E, Suschny O, Rücker W. Effects of trypsin treatment on tissue in culture. *Experimental Cell Research.* 1959;18(1):168–71. doi:10.1016/0014-4827(59)90300-3
114. TrypLE™ Select Enzyme (1X), no phenol red [Internet]. Waltham, MA, USA. 2021 [updated 2025 Apr 09; cited 2021 Sep 29]. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/12563011#/12563011>
115. Choudhary P, Booth H, Gutteridge A, Surmacz B, Louca I, Steer J, Kerby J, Whiting PJ. Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(2):490–501. doi:10.5966/sctm.2016-0088 Cited in: PubMed; PMID 28191760.
116. Zhu Y, Carido M, Meinhardt A, Kurth T, Karl MO, Ader M, Tanaka EM. Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS ONE.* 2013;8(1):e54552. doi:10.1371/journal.pone.0054552 Cited in: PubMed; PMID 23358448.
117. Kamao H, Mandai M, Wakamiya S, Ishida J, Goto K, Ono T, Suda T, Takahashi M, Kiryu J. Objective evaluation of the degree of pigmentation in human induced pluripotent stem cell-derived RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(12):8309–18. doi:10.1167/iovs.14-14694 Cited in: PubMed; PMID 25389202.
118. Sonoda S, Spee C, Barron E, Ryan SJ, Kannan R, Hinton DR. A protocol for the culture and differentiation of highly polarized human retinal pigment

- epithelial cells. *Nat Protoc.* 2009;4(5):662–73. doi:10.1038/nprot.2009.33 Cited in: PubMed; PMID 19373231.
119. Ahmado A, Carr A-J, Vugler AA, Semo M, Gias C, Lawrence JM, Chen LL, Chen FK, Turowski P, Da Cruz L, Coffey PJ. Induction of differentiation by pyruvate and DMEM in the human retinal pigment epithelium cell line ARPE-19. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(10):7148–59. doi:10.1167/iovs.10-6374 Cited in: PubMed; PMID 21743014.
120. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107–26. doi:10.1177/2211068214561025 Cited in: PubMed; PMID 25586998.
121. Gundersen D, Orlowski J, Rodriguez-Boulan E. Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1991;112(5):863–72. doi:10.1083/jcb.112.5.863 Cited in: PubMed; PMID 1847929.
122. Marmorstein AD. The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic.* 2001;2(12):867–72. doi:10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x Cited in: PubMed; PMID 11737824.
123. Mony S, Lee SJ, Harper JF, Barwe SP, Langhans SA. Regulation of Na,K-ATPase β 1-subunit in TGF- β 2-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in human retinal pigmented epithelial cells. *Experimental Eye Research.* 2013;115:113–22. doi:10.1016/j.exer.2013.06.007 Cited in: PubMed; PMID 23810808.
124. Hodson S, Armstrong I, Wigham C. Regulation of the retinal interphotoreceptor matrix Na by the retinal pigment epithelium during the light response. *Experientia.* 1994;50(5):438–41. doi:10.1007/bf01920742 Cited in: PubMed; PMID 8194579.
125. Kaplan JH. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 2002;71:511–35. doi:10.1146/annurev.biochem.71.102201.141218 Cited in: PubMed; PMID 12045105.
126. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrímsson E, Copeland NG, Jenkins NA, Arnheiter H. Mutations at the mouse microphthalmia locus are

- associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 1993;74(2):395–404. doi:10.1016/0092-8674(93)90429-T
127. Bovolenta P, Mallamaci A, Briata P, Corte G, Boncinelli E. Implication of OTX2 in Pigment Epithelium Determination and Neural Retina Differentiation. *J. Neurosci*. 1997;17(11):4243–52. doi:10.1523/JNEUROSCI.17-11-04243.1997
128. Rizzolo LJ. RPE Polarity and Barrier Function. In: Klettner, Dithmar (Hg.) 2020 *Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease*. p. 19–45.
129. Mazzoni F, Safa H, Finnemann SC. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Experimental Eye Research*. 2014;126:51–60. doi:10.1016/j.exer.2014.01.010. Cited in: PubMed; PMID 24780752.
130. Krohne TU, Stratmann NK, Kopitz J, Holz FG. Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2010;90(3):465–71. doi:10.1016/j.exer.2009.12.011 Cited in: PubMed; PMID 20059996.
131. Westenskow PD, Moreno SK, Krohne TU, Kurihara T, Zhu S, Zhang Z-N, Zhao T, Xu Y, Ding S, Friedlander M. Using flow cytometry to compare the dynamics of photoreceptor outer segment phagocytosis in iPS-derived RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2012;53(10):6282–90. doi:10.1167/iovs.12-9721 Cited in: PubMed; PMID 22871841.
132. Artero-Castro A, Long K, Bassett A, Ávila-Fernandez A, Cortón M, Vidal-Puig A, Jendelova P, Rodriguez-Jimenez FJ, Clemente E, Ayuso C, Erceg S. Gene Correction Recovers Phagocytosis in Retinal Pigment Epithelium Derived from Retinitis Pigmentosa-Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2021;22(4). doi:10.3390/ijms22042092 Cited in: PubMed; PMID 33672445.
133. Dalvi S, Galloway CA, Winschel L, Hashim A, Soto C, Tang C, MacDonald LA, Singh R. Environmental stress impairs photoreceptor outer segment (POS) phagocytosis and degradation and induces autofluorescent material accumulation in hiPSC-RPE cells. *Cell Death Discov.* 2019;5:96. doi:10.1038/s41420-019-0171-9 Cited in: PubMed; PMID 31123602.
134. Singh R, Kuai D, Guziewicz KE, Meyer J, Wilson M, Lu J, Smith M, Clark E, Verhoeven A, Aguirre GD, Gamm DM. Pharmacological Modulation of

- Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. *Mol Ther.* 2015;23(11):1700–11.
doi:10.1038/mt.2015.141 Cited in: PubMed; PMID 26300224.
135. Almedawar S, Vafia K, Schreiter S, Neumann K, Khattak S, Kurth T, Ader M, Karl MO, Tsang SH, Tanaka EM. MERTK-Dependent Ensheathment of Photoreceptor Outer Segments by Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium. *Stem Cell Reports.* 2020;14(3):374–89.
doi:10.1016/j.stemcr.2020.02.004 Cited in: PubMed; PMID 32160519.
136. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA. Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research.* 2005;81(5):581–91.
doi:10.1016/j.exer.2005.03.017 Cited in: PubMed; PMID 15949798.
137. Jiang L, Liu CY, Yang QF, Wang P, Zhang W. Plasma level of growth arrest-specific 6 (GAS6) protein and genetic variations in the GAS6 gene in patients with acute coronary syndrome. *Am J Clin Pathol.* 2009;131(5):738–43.
doi:10.1309/AJCP3CX3AUVRBHF Cited in: PubMed; PMID 19369636.
138. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron.* 2012;76(6):1123–32.
doi:10.1016/j.neuron.2012.10.015 Cited in: PubMed; PMID 23259948.
139. Jastrzebska B, Maeda T, Zhu L, Fotiadis D, Filipek S, Engel A, Stenkamp RE, Palczewski K. Functional characterization of rhodopsin monomers and dimers in detergents. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279(52):54663–75.
doi:10.1074/jbc.M408691200 Cited in: PubMed; PMID 15489507.
140. Baxter LL, Pavan WJ. Pmel17 expression is Mitf-dependent and reveals cranial melanoblast migration during murine development. *Gene Expr Patterns.* 2003;3(6):703–7. doi:10.1016/j.modgep.2003.07.002 Cited in: PubMed; PMID 14643677.
141. Tian Z, Liu Q, Lin H-Y, Zhu Y-R, Ling L, Sung T-C, Wang T, Li W, Gao M, Cheng S, Renuka RR, Subbiah SK, Fan G, Wu G-J, Higuchi A. Effects of ECM protein-coated surfaces on the generation of retinal pigment epithelium cells differentiated from human pluripotent stem cells. *Regen Biomater.* 2024;11rbae091. doi:10.1093/rb/rbae091 Cited in: PubMed; PMID 39233867.

142. Smith EN, D'Antonio-Chronowska A, Greenwald WW, Borja V, Aguiar LR, Pogue R, Matsui H, Benaglio P, Borooh S, D'Antonio M, Ayyagari R, Frazer KA. Human iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium: A Model System for Prioritizing and Functionally Characterizing Causal Variants at AMD Risk Loci. *Stem Cell Reports.* 2019;12(6):1342–53. doi:10.1016/j.stemcr.2019.04.012
Cited in: PubMed; PMID 31080113.
143. Michelet F, Balasankar A, Teo N, Stanton LW, Singhal S. Rapid generation of purified human RPE from pluripotent stem cells using 2D cultures and lipoprotein uptake-based sorting. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):47. doi:10.1186/s13287-020-1568-3 Cited in: PubMed; PMID 32014053.
144. Holtkamp GM, van Rossem M, Vos AF de, Willekens B, Peek R, Kijlstra A. Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin Exp Immunol.* 1998;112(1):34–43. doi:10.1046/j.1365-2249.1998.00560.x
Cited in: PubMed; PMID 9566787.
145. Plaza Reyes A, Petrus-Reurer S, Padrell Sánchez S, Kumar P, Douagi I, Bartuma H, Aronsson M, Westman S, Lardner E, André H, Falk A, Nandrot EF, Kvanta A, Lanner F. Identification of cell surface markers and establishment of monolayer differentiation to retinal pigment epithelial cells. *Nat Commun.* 2020;11(1):1609. doi:10.1038/s41467-020-15326-5 Cited in: PubMed; PMID 32231223.
146. Jang S, Kang HT, Hwang ES. Nicotinamide-induced mitophagy: event mediated by high NAD+/NADH ratio and SIRT1 protein activation. *J Biol Chem.* 2012;287(23):19304–14. doi:10.1074/jbc.M112.363747 Cited in: PubMed; PMID 22493485.
147. Gomes AP, Price NL, Ling AJY, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, White JP, Teodoro JS, Wrann CD, Hubbard BP, Mercken EM, Palmeira CM, Cabo R de, Rolo AP, Turner N, Bell EL, Sinclair DA. Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell.* 2013;155(7):1624–38. doi:10.1016/j.cell.2013.11.037 Cited in: PubMed; PMID 24360282.
148. Mitchell SJ, Bernier M, Aon MA, Cortassa S, Kim EY, Fang EF, Palacios HH, Ali A, Navas-Enamorado I, Di Francesco A, Kaiser TA, Waltz TB, Zhang N, Ellis JL, Elliott PJ, Frederick DW, Bohr VA, Schmidt MS, Brenner C, Sinclair DA,

- Sauve AA, Baur JA, Cabo R de. Nicotinamide Improves Aspects of Healthspan, but Not Lifespan, in Mice. *Cell Metab.* 2018;27(3):667-676.e4. doi:10.1016/j.cmet.2018.02.001 Cited in: PubMed; PMID 29514072.
149. Ross AC, Zolfaghari R. Cytochrome P450s in the regulation of cellular retinoic acid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2011;31:65–87. doi:10.1146/annurev-nutr-072610-145127 Cited in: PubMed; PMID 21529158.
150. Bastien J, Rochette-Egly C. Nuclear retinoid receptors and the transcription of retinoid-target genes. *Gene.* 2004;328:1–16. doi:10.1016/j.gene.2003.12.005 Cited in: PubMed; PMID 15019979.
151. Fields AL, Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids in biological control and cancer. *J Cell Biochem.* 2007;102(4):886–98. doi:10.1002/jcb.21530 Cited in: PubMed; PMID 17902161.
152. Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 2006;66(7):606–30. doi:10.1002/neu.20242 Cited in: PubMed; PMID 16688755.
153. Wei L-N. Retinoid receptors and their coregulators. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:47–72. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.140301 Cited in: PubMed; PMID 12142470.
154. Duester G. Keeping an eye on retinoic acid signaling during eye development. *Chem Biol Interact.* 2009;178(1-3):178–81. doi:10.1016/j.cbi.2008.09.004 Cited in: PubMed; PMID 18831967.
155. Söderpalm AK, Fox DA, Karlsson JO, van Veen T. Retinoic acid produces rod photoreceptor selective apoptosis in developing mammalian retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):937–47. Cited in: PubMed; PMID 10711716.
156. Cvekl A, Wang W-L. Retinoic acid signaling in mammalian eye development. *Experimental Eye Research.* 2009;89(3):280–91. doi:10.1016/j.exer.2009.04.012 Cited in: PubMed; PMID 19427305.
157. Hyatt GA, Schmitt EA, Fadool JM, Dowling JE. Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):13298–303. doi:10.1073/pnas.93.23.13298 Cited in: PubMed; PMID 8917585.

158. Kelley MW, Williams RC, Turner JK, Creech-Kraft JM, Reh TA. Retinoic acid promotes rod photoreceptor differentiation in rat retina *in vivo*. *Neuroreport*. 1999;10(11):2389–94. doi:10.1097/00001756-199908020-00031 Cited in: PubMed; PMID 10439469.
159. Khanna H, Akimoto M, Siffroi-Fernandez S, Friedman JS, Hicks D, Swaroop A. Retinoic acid regulates the expression of photoreceptor transcription factor NRL. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(37):27327–34. doi:10.1074/jbc.M605500200 Cited in: PubMed; PMID 16854989.
160. Milam AH, Possin DE, Huang J, Fariss RN, Flannery JG, Saari JC. Characterization of aldehyde dehydrogenase-positive amacrine cells restricted in distribution to the dorsal retina. *Vis Neurosci*. 1997;14(3):601–8. doi:10.1017/s0952523800012256 Cited in: PubMed; PMID 9194326.
161. Edwards RB, Adler AJ, Dev S, Claycomb RC. Synthesis of retinoic acid from retinol by cultured rabbit Müller cells. *Experimental Eye Research*. 1992;54(4):481–90. doi:10.1016/0014-4835(92)90126-D
162. McCaffery P, Mey J, Dräger UC. Light-mediated retinoic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12570–4. doi:10.1073/pnas.93.22.12570 Cited in: PubMed; PMID 8901623.
163. Xia Q-Q, Zhang L-M, Zhou Y-Y, Wu Y-L, Li J. All-trans-retinoic acid generation is an antidotal clearance pathway for all-trans-retinal in the retina. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019;20(12):960–71. doi:10.1631/jzus.B1900271 Cited in: PubMed; PMID 31749343.
164. Doyle JW, Dowgiert RK, Buzney SM. Retinoic acid metabolism in cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(3):708–17. Cited in: PubMed; PMID 7890501.
165. Doyle JW, Dowgiert RK, Buzney SM. Factors modulating the effect of retinoids on cultured retinal pigment epithelial cell proliferation. *Curr Eye Res*. 1992;11(8):753–65. doi:10.3109/02713689209000749 Cited in: PubMed; PMID 1385038.
166. Kishi H, Mishima HK, Yamashita U. Effects of retinoic acid and TGF-beta 1 on the proliferation and melanin synthesis in chick retinal pigment epithelial cells in

- vitro. *Curr Eye Res.* 1998;17(5):483–6. doi:10.1076/ceyr.17.5.483.5192 Cited in: PubMed; PMID 9617542.
167. MacDonald IM, Peters C, Chen MH. Effect of retinoic acid on wound healing of laser burns to porcine retinal pigment epithelium. *Can J Ophthalmol.* 1996;31(4):175–8. Cited in: PubMed; PMID 8804754.
168. Wu W-C, Hu D-N, Mehta S, Chang Y-C. Effects of retinoic acid on retinal pigment epithelium from excised membranes from proliferative vitreoretinopathy. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2005;21(1):44–54. doi:10.1089/jop.2005.21.44 Cited in: PubMed; PMID 15718827.
169. Kennedy A, Frank RN. Cultured ocular cells and extracellular matrices: role of growth factors, retinoic acid and cell polarity. *Curr Eye Res.* 1993;12(8):693–702. doi:10.3109/02713689308995764 Cited in: PubMed; PMID 8222729.
170. Yasunari T, Yanagihara N, Komatsu T, Moriwaki M, Shiraki K, Miki T, Yano Y, Otani S. Effect of retinoic acid on proliferation and polyamine metabolism in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Ophthalmic Res.* 1999;31(1):24–32. doi:10.1159/000055509 Cited in: PubMed; PMID 9831819.
171. Campochiaro PA, Hackett SF, Conway BP. Retinoic acid promotes density-dependent growth arrest in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(1):65–72. Cited in: PubMed; PMID 1846132.
172. Rong J, Liu S. Effect of all-trans retinoic acid on the barrier function in human retinal pigment epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;407(3):605–9. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.080 Cited in: PubMed; PMID 21426899.
173. Chang Y-C, Kao Y-H, Hu D-N, Tsai L-Y, Wu W-C. All-trans retinoic acid remodels extracellular matrix and suppresses laminin-enhanced contractility of cultured human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research.* 2009;88(5):900–9. doi:10.1016/j.exer.2008.11.028 Cited in: PubMed; PMID 19094985.
174. Tokarz P, Piastowska-Ciesielska AW, Kaarniranta K, Blasiak J. All-Trans Retinoic Acid Modulates DNA Damage Response and the Expression of the VEGF-A and MKI67 Genes in ARPE-19 Cells Subjected to Oxidative Stress. *Int*

J Mol Sci. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060898 Cited in: PubMed; PMID 27314326.

175. Boles NC, Fernandes M, Swigut T, Srinivasan R, Schiff L, Rada-Iglesias A, Wang Q, Saini JS, Kiehl T, Stern JH, Wysocka J, Blenkinsop TA, Temple S. Epigenomic and Transcriptomic Changes During Human RPE EMT in a Stem Cell Model of Epiretinal Membrane Pathogenesis and Prevention by Nicotinamide. *Stem Cell Reports*. 2020;14(4):631–47. doi:10.1016/j.stemcr.2020.03.009 Cited in: PubMed; PMID 32243845.
176. Kobayashi Y, Tokuda K, Yamashiro C, Higashijima F, Yoshimoto T, Ota M, Ogata T, Ashimori A, Hatano M, Kobayashi M, Uchi S-H, Wakuta M, Kimura K. Inhibition of epithelial-mesenchymal transition in retinal pigment epithelial cells by a retinoic acid receptor- α agonist. *Sci Rep*. 2021;11(1):11842. doi:10.1038/s41598-021-90618-4 Cited in: PubMed; PMID 34088917.
177. Ferguson TA, Green DR. Autophagy and phagocytosis converge for better vision. *Autophagy*. 2014;10(1):165–7. doi:10.4161/auto.26735 Cited in: PubMed; PMID 24220227.
178. Jadeja RN, Powell FL, Jones MA, Fuller J, Joseph E, Thounaojam MC, Bartoli M, Martin PM. Loss of NAMPT in aging retinal pigment epithelium reduces NAD $^{+}$ availability and promotes cellular senescence. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(6):1306–23. doi:10.18632/aging.101469 Cited in: PubMed; PMID 29905535.
179. Chen X, Amorim JA, Moustafa GA, Lee J-J, Yu Z, Ishihara K, Iesato Y, Barbisan P, Ueta T, Togka KA, Lu L, Sinclair DA, Vavvas DG. Neuroprotective effects and mechanisms of action of nicotinamide mononucleotide (NMN) in a photoreceptor degenerative model of retinal detachment. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):24504–21. doi:10.18632/aging.202453 Cited in: PubMed; PMID 33373320.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATRA	<i>all-trans-retinoic acid</i> , all-trans-Retinsäure
BMP-4	<i>bone morphogenetic protein 4</i> , Knochenmorphogenetisches Protein 4
bRPE	<i>byproduct RPE</i> , RPE als Nebenprodukt
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS 1x
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
FBS	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
GFR	<i>growth factor reduced</i> , mit verminderter Wachstumsfaktor-Anteil
hESC	<i>human embryonic stemm cells</i> , humane embryonale Stammzellen
iPS-Zelle/Zelllinie	humane induzierte pluripotente Stammzelle/Stammzelllinie
ICC	<i>Immunocytochemistry</i> , Immunzytochemie
KOSR	Knock Out Serum Replacement
kRPE	RPE differenziert nach Tim Krohne (68)
mAK	monoklonaler Antikörper

MRA	Mycoplasma Removal Agent
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NIM	neuronales Induktionsmedium
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
POS	<i>photoreceptor outer segments</i> , Photorezeptor-Außensegmente
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
RAR	<i>retinoic acid receptor</i> , Retinsäure-Rezeptor
RDM	retinales Differenzierungsmedium
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RC-PBS	Roche-cOmplete™-PBS
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese
SMb	Standardmedium für bRPE-Zellen
SMk	Standardmedium für kRPE-Zellen
SMro	Standardmedium für retinale Organdoide
TBS	<i>tris buffered saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i> , transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethylethylenediamin

9. Abbildungsverzeichnis

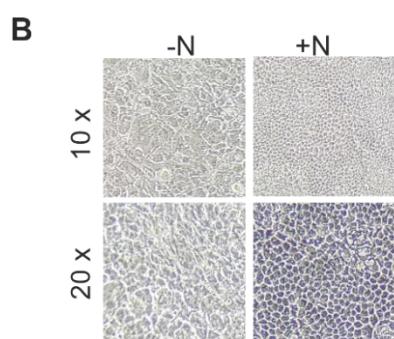
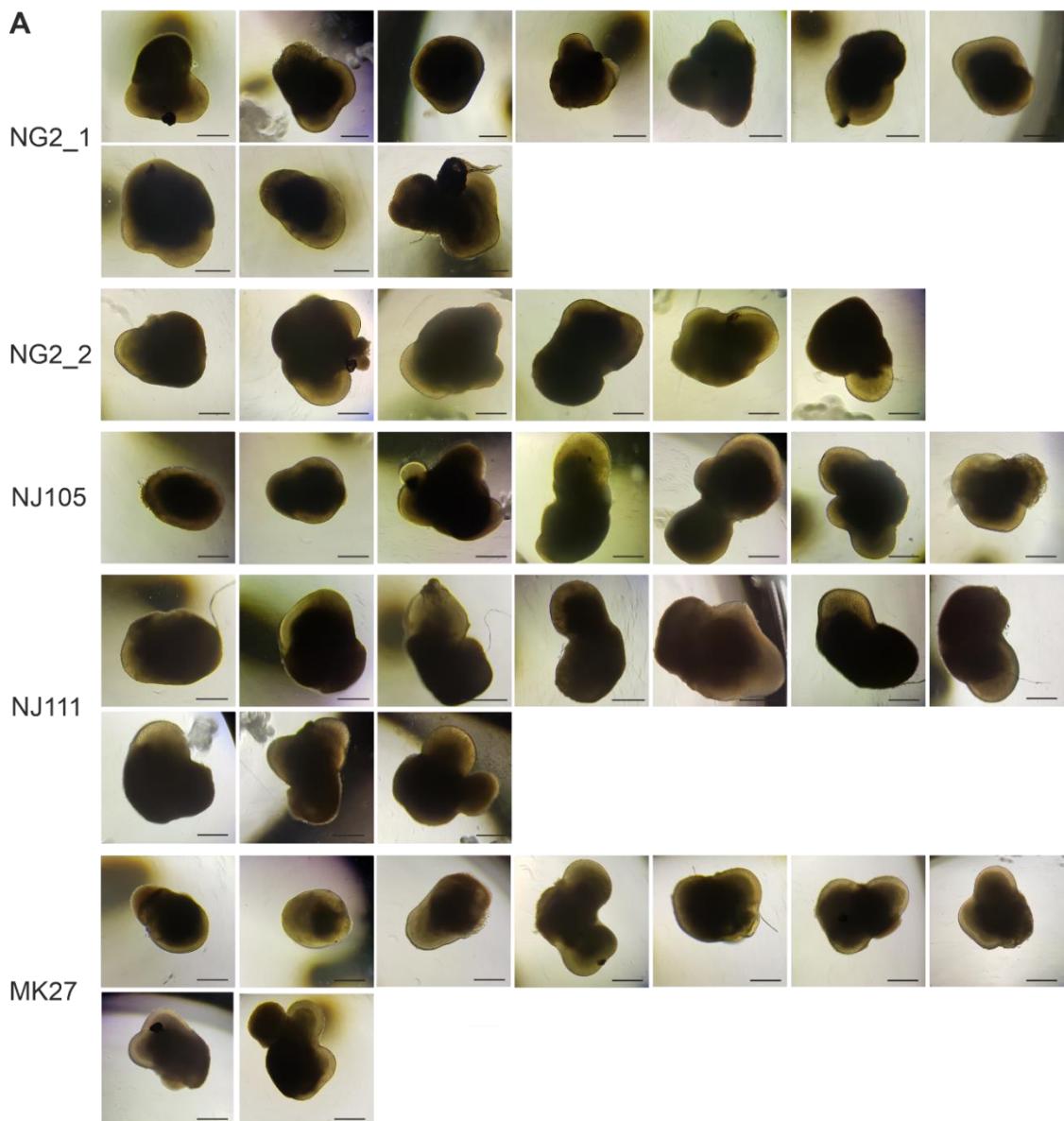
Abbildung 1: Schematische Zeichnung der embryonalen Entwicklung des Auges.....	7
Abbildung 2: Schematische Zeichnung des RPE mit Darstellung seiner Funktionen.....	8
Abbildung 3: Schematische Zeichnung der Schichten und Zelltypen der menschlichen Retina und eines retinalen Organoids	11
Abbildung 4: Schematische Übersicht zur Differenzierung der iPS-Zellen zu retinalen Organoiden und bRPE-Zellen.....	32
Abbildung 5: Vergleichbarer Anstieg der TEER-Messwerte über einen Zeitraum von 6 Wochen bei bRPE- und kRPE-Zellen	51
Abbildung 6: Expression und korrekte Lokalisation von RPE-Marker-Proteinen und dem Tight-Junction-Protein ZO-1 bei bRPE-Zellen	53
Abbildung 7: Expression und korrekte Lokalisation von ZO-1 bei bRPE-Zellen nach Kryokonservierung.....	55
Abbildung 8: Phagozytose-Experimente mit porzinen POS.....	57
Abbildung 9: Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen bei bRPE-Zellen ..	59
Abbildung 10: Nachweis der Expression von RPE-Marker-Genen bei bRPE- Zellen.....	61

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete iPS-Zelllinien	17
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	17
Tabelle 3: Verwendete Primärantikörper	19
Tabelle 4: Verwendete Sekundärantikörper	19
Tabelle 5: Verwendete Molekularmassenstandards	20
Tabelle 6: Verwendete Enzyme.....	20
Tabelle 7: Verwendete Kit-Systeme	20
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide	20
Tabelle 9: Verwendete Medien und Zusätze	21

Tabelle 10: Verwendete Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 11: Verwendetes Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 12: Verwendete Geräte.....	27
Tabelle 13: Verwendete Software.....	29
Tabelle 14: Zusammensetzung NIM.....	31
Tabelle 15: Zusammensetzung RDM	31
Tabelle 16: Zellkulturmedium der retinalen Organoide bzw. bRPE-Zellen vom 43. bis 90. Tag der Differenzierung	33
Tabelle 17: Zusammensetzung SMro bzw. SMb (Zellkulturmedium der retinalen Organoide bzw. der bRPE-Zellen ab Tag 91 der Differenzierung)	34
Tabelle 18: Zusammensetzung SMk	38
Tabelle 19: Zusammensetzung der für die ICC verwendeten Lösungen	40
Tabelle 20: Zusammensetzung des Polyacrylamid-Trenngels (12,5 %) und des Polyacrylamid-Sammelgels (3 %).....	43
Tabelle 21: Zusammensetzung der für die Westernblot-Analyse verwendeten Antikörper-Lösungen	44
Tabelle 22: Arbeitsschritte zur Isolation der mRNA	46
Tabelle 23: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese	47
Tabelle 24: Einfacher Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese	47
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die qRT-PCR	48
Tabelle 26: Programm für die qRT-PCR.....	48

11. Appendix



Ergänzende Abbildung 1: Lichtmikroskopische Aufnahmen der in dieser Arbeit differenzierten retinalen Organoide und der bRPE-Zellen

(A) Aufnahmen der retinalen Organoide unter 4-facher Vergrößerung je an Tag 91 der Differenzierung (außer NJ111 an Tag 93). Maßstabsleiste: 500 µm. (B) Aufnahme der bRPE-Differenzierung NJ111 an Tag 138 (Passage 3) unter 10-facher (10x) und 20-facher (20x) Vergrößerung. Dem Zellkulturmedium wurde während der

Differenzierung 10 mM Nicotinamid zugesetzt (+N) oder nicht (-N). Unter 20-facher Vergrößerung wirkte die bRPE-Differenzierung mit Nicotinamid stärker pigmentiert. Außerdem ist die typische hexagonale Morphologie der RPE-Zellen zu erkennen.

Ergänzende Tabelle 1: Übersicht über die wöchentlich erhobenen TEER-Messwerte angegeben als Mittelwert (+/- Standardabweichung) und Minimal- und Maximalwerte (Min/Max)

	Woche	MW (+/- SD)	Min/Max
kRPE (n = 5)	1	61,80 (28,38)	34,02/90,72
	2	171,57 (61,67)	99,23/268,76
	3	213,65 (69,58)	100,36/274,43
	4	267,17 (84,45)	152,52/343,60
	5	246,87 (68,18)	152,52/315,25
	6	301,42 (83,40)	207,52/384,99
bRPE (n = 6)	1	18,81 (23,87)	-19,85/41,96
	2	101,12 (117,04)	-60,10/203,55
	3	139,48 (132,80)	-15,31/328,86
	4	201,66 (184,86)	-5,67/523,91
	5	215,17 (188,74)	23,81/529,58
	6	229,35 (199,33)	13,04/548,86
bRPE → SMro (n = 6)	4	65,87 (47,81)	2,27/139,48
	5	29,20 (26,06)	-2,84/74,84
	6	59,35 (57,30)	19,28/168,97

Ergänzende Tabelle 2: Übersicht über die Inkubation der einzelnen bRPE-Zelllinien mit verschiedenen Antikörpern

Inkubation mit Antikörpern gegen	eingesetzte bRPE-Zelllinien
BEST, ZO-1	MK26_1, MK27_1, MK27_2, NG2_1, NG3_2, NJ105_3
OTX2	MK27_3, NG3_3, NJ111_2
ATP1B1	MK26_2, NJ105_2

Ergänzende Tabelle 3: Übersicht über die in der mRNA-Expressionsanalyse untersuchten Zelllinien

untersuchtes Gen	untersuchte iPS-Zelllinien	untersuchte bRPE-Zelllinien (+ N)	untersuchte bRPE-Zelllinien (- N)
<i>BEST1</i>	MK 26 (3), NG2 (3) NJ111 (2)	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ111_1, NJ111_2
<i>MITF</i>	MK26 (2), NG2 (2), NJ111(1)	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_2	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2
<i>PMEL</i>	MK26 (2), NG2 (2), NJ111(1)	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_2	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2
<i>RPE65</i>	MK26 (1), NG2 (1)	MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2	MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2

Die Anzahl der technischen Replikate ist nach der Klonierungsnummer in Klammern angegeben, experimentelle Replikate sind einzeln aufgelistet und werden durch eine Ziffer nach der Klonierungsnummer unterschieden.

Ergänzende Tabelle 4: Überblick über die Anzahl der untersuchten mRNA-Proben (n) und die relative Genexpression von RPE-Marker Genen angegeben als Mittelwert (+/- SD)

mRNA-Proben	Relative Genexpression	n	MW (+/- SD)	Min/Max
iPS-Zellen	<i>BEST1</i>	8	1,03 (+/- 0,29)	0,75/1,50
	<i>MITF</i>	5	1,01 (+/- 0,09)	0,88/1,13
	<i>PMEL</i>	5	1,00 (+/- 0,09)	0,86/1,08
	<i>RPE65</i>	2	1,00 (+/- 0,00)	1,00/1,00
bRPE +N	<i>BEST1</i>	14	26.140,87 (+/-16.814,82)	13,21/71.260,06

	<i>MITF</i>	13	514,06 (+/- 138,83)	315,30/817,54
	<i>PMEL</i>	12	106,75 (+/- 51,14)	58,21/199,05
	<i>RPE65</i>	8	204.005,30 (+/- 191.834,19)	95,25/446585,23
bRPE -N	<i>BEST1</i>	13	1.247,16 (+/- 3051,19)	9,37/10.883,94
	<i>MITF</i>	13	144,91 (+/- 207,89)	8,97/665,56
	<i>PMEL</i>	13	29,96 (+/- 50,94)	0,00/122,25
	<i>RPE65</i>	8	1.913,71 (+/- 3.069,46)	61,54/8.283,08

Ergänzende Tabelle 5: Überblick über die in der mRNA-Expressionsanalyse untersuchten Zelllinien

mRNA-Proben	eingeschlossene Zelllinien (<i>BEST1</i>)	eingeschlossene Zelllinien (<i>RPE65</i>)
iPS-Zellen	NG2 (2), NJ111 (1), MK27 (1)	NG2 (2), MK27 (1)
kRPE	NG3 (1), NJ105 (1), NJ111 (1), MK27 (1)	NG3 (1), NJ105 (1), NJ111 (1), MK27 (1)
bRPE SMb	NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NJ105_3, NJ111_1, MK26_2	NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NJ105_3, NJ111_1, MK26_2, MK27_2
bRPE SMb→SMro	NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2	NG2_2, NG3_1, NG3_2; NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_1, MK26_2, MK27_1, MK27_2
bRPE SMk	NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_1, MK26_2, MK27_1	NG2_2, NG3_1, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_1, MK26_2, MK27_1
bRPE SMk→SMro	NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3	NG2_1, NG2_2, NG3_1, NG3_2, NG3_3, NJ105_2, NJ105_3, NJ111_1, NJ111_2, MK26_2, MK27_1, MK27_2, MK27_3

Die Anzahl der technischen Replikate ist nach der Klonierungsnummer in Klammern angegeben, experimentelle Replikate sind einzeln aufgelistet und werden durch eine Ziffer nach der Klonierungsnummer unterschieden.

Ergänzende Tabelle 6: Überblick über die Anzahl der untersuchten mRNA-Proben (n) und die relative Genexpression von *BEST1* und *RPE65*

mRNA-Proben	Relative Genexpression	n	MW (+/-SD)	Min/Max
iPS-Zellen	<i>BEST1</i>	4	0,00 (0,00)	0,00/0,00
	<i>RPE65</i>	3	0,00 (0,00)	0,00/0,00
kRPE	<i>BEST1</i>	4	1,04 (0,32)	0,68/1,46
	<i>RPE65</i>	4	1,01 (0,13)	0,85/1,17
bRPE SMb	<i>BEST1</i>	7	0,71 (0,47)	0,05/1,33
	<i>RPE65</i>	8	0,37 (0,22)	0,03/0,69
bRPE SMb→SMro	<i>BEST1</i>	12	0,37 (0,23)	0,00/0,78
	<i>RPE65</i>	12	0,12 (0,09)	0,00/0,31
bRPE SMk	<i>BEST1</i>	10	0,80 (0,31)	0,21/1,07
	<i>RPE65</i>	10	0,46 (0,24)	0,11/0,87
bRPE SMk→SMro	<i>BEST1</i>	13	0,33 (0,13)	0,06/0,46
	<i>RPE65</i>	13	0,07 (0,05)	0,01/0,17

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all jenen bedanken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber, für die Möglichkeit, in seinem Labor zu promovieren und einen spannenden Einblick in das Gebiet der Netzhautforschung zu erhalten.

Zudem möchte ich Prof. Dr. med. Caroline Brandl für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Ein großes Dankeschön auch meiner Betreuerin, Dr. med. Patricia Berber, für ihre exzellente, engagierte Betreuung und ihre wertvollen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt auch Nico Hertel, der mir mit seiner Expertise bei der Kultivierung von Stammzellen mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine hilfreichen Hinweise und praktischen Tipps haben einen wichtigen Beitrag zu meiner Arbeit geleistet.

Ebenso danke ich herzlich Lisa Michaelis für ihre geduldige Betreuung und tatkräftige Unterstützung im Labor. Die gemeinsame Arbeit an der Kultivierung von retinalen Organoiden und RPE-Zellen war nicht nur fachlich bereichernd, sondern hat mir auch persönlich viel bedeutet.

Frau Dr. rer. physiol. Karolina Plössl möchte ich für ihre Unterstützung bei den POS-Phagozytose-Experimenten und der Auswertung der Daten danken. Ihr technisches Know-how und ihre praktische Hilfe haben wesentlich zum Gelingen dieser Untersuchung beigetragen.

Dem gesamten Team des Labors des Instituts für Humangenetik danke ich für die herzliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zuletzt widme ich diese Arbeit meiner Familie, meinen Schwiegereltern und meinem Mann. Ohne Eure Liebe, Geduld, Euer Verständnis und bedingungslose Unterstützung wäre mein bisheriger Lebensweg und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ricarda Bühler, geboren am 13.10.1987 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegeben Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Ricarda Bühler