

# **Anti-apoptotischer Gentransfer in Hornhautendothelzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für  
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

**Thomas Armin Fuchsluger**  
**aus Dillingen/Donau**

Februar 2014

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Universitätsklinikum der Universität Duisburg-Essen (Institut für Anatomie, Zentrum für Augenheilkunde) und am Schepens Eye Research Institute, Department of Ophthalmology, Harvard Medical School, Boston MA, USA, durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Singer
2. Gutachter: Prof. Dr. Opalka
3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Küppers

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2014

Die hier aufgeführten Daten wurden in folgenden Journalen veröffentlicht:

**Fuchsluger TA**, Jurkunas U, Kazlauskas A, Dana R. Anti-apoptotic Gene Therapy prolongs Survival of Corneal Endothelial Cells during Storage. *Gene Ther.* 2011 Aug;18(8):778-87 [IF 2010 4,538] (*Publikation 1*)

**Fuchsluger TA**, Jurkunas U, Kazlauskas A, Dana R. Corneal Endothelial Cells are protected from Apoptosis by Gene Therapy. *Hum Gene Ther.* 2011 May;22(5):549-58 [IF 2010 4,829] (*Publikation 2*)

**Fuchsluger TA**, Jurkunas U, Kazlauskas A, Dana R. Virale Vektoren für den [Viral Vectors for Gene Delivery to Corneal Endothelial Cells.] *Klin Monbl Augenheilkd.* 2011 Jun;228(6):498-503. Epub 2011 Jun 7 [IF 2010 0,542] (*Publikation 3*)

## **Danksagung**

Ich danke herzlich PD Dr. Bernhard B. Singer sowie Prof. Dr. Reza Dana für die Unterstützung meiner Arbeit. Weiterhin gilt mein Dank meiner verstorbenen Frau Miriam und meinem Sohn Florentin für Ihre Geduld und Ihre andauernde Unterstützung.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>I. Einleitung, Stand der Forschung, theoretischer Hintergrund</b>	<b>1</b>
I.1 Die Bedeutung des Hornhautendothels für die Sehkraft	2
I.2 Der Untergang kornealer Endothelzellen im Zusammenhang mit der Hornhauttransplantation	3
I.3 Die Bedeutung von Apoptose kornealer Endothelzellen	4
1. Apoptotische Mechanismen	4
2. Die Bedeutung von Apoptose in endogen und iatrogen hervorgerufenen Hornhautpathologien	8
3. Der Untergang des Hornhautendothels und Transplantatversagen	9
4. Die Bedeutung von Endothelverlust hinsichtlich der Qualität von Spenderhornhäuten i.R. der Hornhautkultivierung	10
5. Zusammenhang zwischen Kultivierung und Apoptose des Hornhautendothels	11
6. Die Bedeutung des Hornhautmetabolismus während der Hornhautkultivierung	12
7. Neue Ansätze: Gentherapie zum Schutz kornealer Endothelzellen vor Zelluntergang	13
 <b>II Ziele der Studie, Fragestellungen, Hypothesen</b>	 <b>15</b>
 <b>III. Materialien und Methoden</b>	 <b>16</b>
III.1 Hervorrufen von Apoptose und von Zellverlust	16
III.2 Detektion und Messung von Apoptose	17
III.3 Lentivirales Expressionssystem	18
III.4 Gentransfer in korneale Endothelzellen	19
Gentransfer in korneale Endothelzellen zur Verhinderung <i>triggervermittelter Apoptose</i>	
Gentransfer in Hornhäute bei <i>Kultivierungsexperimenten</i>	
III.5 Detektion der transgenen Expression, Messung von Apoptose	20
III.6 Kultivierung kornealer Endothelzellsuspensionen und von Hornhäuten	21
III.7 Detektion des Verlusts kornealer Endothelzellen und	

Bestimmung der Endothelzellmorphologie	21
III.8 Statistische Auswertung	22
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
IV.1 Hervorrufen und Detektion von Apoptose bei primären und immortalisierten kornealen Endothelzellen	23
IV.2 Hervorrufen und Detektion von Apoptose bei Endothelzellen von Hornhäuten	25
IV.3 Die Kinetik der IZsGreenW-Expression in primären und immortalisierten kornealen Endothelzellen, in Suspensionen und bei Hornhäuten	27
IV.4 Bcl-xL und p35 schützten korneale Endothelzellen vor Apoptose auslösenden Substanzen, p35 war effizienter als Bcl-xL gegen intrinsische Apoptose	29
IV.5 Die Expression anti-apoptotischer Proteine in kornealen Endothelzellen bewahrte die Zellmorphologie und schützte vor starken Apoptose auslösenden Substanzen	31
IV.6 Die Expression anti-apoptotischer Proteine führte zu reduzierter Apoptose von CEC während Langzeitkultivierung von Hornhäuten und zu einem Rückgang der Caspase 3	33
IV.7 Beurteilung der Dichte und der Morphologie kornealer Endothelzellen während Kultivierung unter hypothermen Bedingungen bei 4°C	35
IV.8 Transduktion mit hohen Titern führte zu Toxizität für korneale Endothelzellen	37
IV.9 Korneale Endothelzellen, welche anti-apoptotische Proteine überexprimierten, bewahrten physiologische Zellmorphologie	37
IV.10 Die Dichte kornealer Endothelzellen und ihre Morphologie während der Hornhautkultivierung	38
IV.11 Die Expression anti-apoptotischer Proteine verlängerte das Überleben kornealer Endothelzellen bei Spenderhornhautpaaren	40
IV.12 Bestimmung der Viabilität kornealer Endothelzellen von Hornhäuten während Langzeitkultivierung	42

<b>V. Diskussion</b>	<b>44</b>
V.1 Lentivirale Vektoren für Gentransfer in korneale Endothelzellen	44
V.2 Gentransfer in korneale Endothelzellen inhibiert Apoptose	45
V.3 Anti-apoptotischer Gentransfer schützt korneale Endothelzellen während der Hornhautkultivierung	46
V.4 Molekulare Mechanismen von Bcl-xL und p35	47
V.5 Translation diese Gentherapieansatzes in die Klinik	48
<b>VI. Zusammenfassung, Ausblick</b>	<b>51</b>
<b>VII. Literaturstellen</b>	<b>53</b>
<b>VIII. Anhang</b>	<b>65</b>
VIII.1 Curriculum vitae	65
VIII.2 Eidesstattliche Erklärung	70f.

## Abkürzungen

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AnnV	Annexin V
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-Zell Lymphom 2, erstes Mitglied der Bcl-2 Familie von apoptoseregulatorischen Proteinen, kodiert von dem Bcl2 Gen
Bcl-xL	B-Zell Lymphom-extra large, Mitglied der Bcl-2 Familie, anti-apoptotisches Protein
C	Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CEC	korneale Endothelzellen, Hornhautendothelzellen
DMEK	Deszemetmembran-Endothel-Keratoplastik
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSEK	Deszemetstripping-Endothel-Keratoplastik
EBAA	Eye Bank Association of America
EEBA	European Eye Bank Association
et al.	et alii ("und andere")
FACS	Durchflusszytometrie (fluoreszein-aktiviertes Zellsortieren)
FasR, FasL	Fas Rezeptor / Ligand, Todesrezeptor an der Zelloberfläche
FCS	fötales Kälberserum
h	Stunde(n)
HGTI	Harvard Gene Therapy Initiative, Harvard Medical School
IAP	Inhibitor der Apoptose, Proteinfamilie zur Suppression von Apoptose
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 beta
IZsGreenW	ein grün fluoreszierendes Protein
P35	Pan-Caspaseinhibitor, anti-apoptotisch, isoliert vom Baculovirus
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PI	Propidiumjod
sog.	sogenannte(r,s)
Survivin	baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5 (BIRC5)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor – alpha
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick-end labelling, Apoptoseassay
z. B.	zum Beispiel

## Abbildungen

	<b>Seite</b>
<b>Abbildung 1.</b> Hornhauttransplantat mit Abstoßungszeichen	2
<b>Abbildung 2.</b> Schema zu in- und extrinsischen apoptotischen Signalwegen und den Interaktionen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL, IAP, Survivin und p35 mit der Caspasekaskade	5
<b>Abbildung 3.</b> Nachweis von Apoptose bei humanen kornealen Endothelzellen	7
<b>Abbildung 4.</b> Detektion der DNA Fragmentierung	9
<b>Abbildung 5.</b> Konzeptionelle Abbildung zur Veranschaulichung der Rolle apoptotischen Endothelzelluntergangs vor und nach Hornhauttransplantation	14
<b>Abbildung 6.</b> Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose humaner kornealer Endothelzellen	23, 25
<b>Abbildung 7.</b> Ansteigende Annexin V-Positivität von CEC in Hornhäuten nach Behandlung mit Apoptose auslösenden Substanzen	26
<b>Abbildung 8.</b> Kinetik der IZsGreenW Expression in CEC	28
<b>Abbildung 9.</b> Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder p35 führte zu signifikant reduzierter Apoptose in primären, aber nicht in immortalisierten CEC	30, 31
<b>Abbildung 10.</b> Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder p35 schützt gleichermaßen CEC von Hornhäuten vor Apoptose, unabhängig des apoptotischen Signalwegs	32
<b>Abbildung 11.</b> Die Expression anti-apoptotischer Proteine durch CEC führte zu verminderter Apoptose während Langzeitkultivierung	34
<b>Abbildung 12.</b> Untersuchung der Dichte und der Morphologie kornealer Endothelzellen während hypothermer Lagerung bei 4°C	36, 38
<b>Abbildung 13.</b> Messungen der Dichten und der Morphologien kornealer Endothelzellen während Organkultivierung von Hornhäuten	39
<b>Abbildung 14.</b> Die Überexpression anti-apoptotischer Proteine führte zu verlängertem CEC- Überleben beim Vergleich von Spenderhornhautpaaren kultiviert unter Bedingungen ähnlich einer Hornhautbank	42
<b>Abbildung 15.</b> Zellviabilität während Langzeitkultivierung	43

**Tabellen**

	<b>Seite</b>
Tabelle: Überblick über die Kultivierungsexperimente	17

## **I. Einleitung, Stand der Forschung, theoretischer Hintergrund**

Die Hornhauttransplantation ist die am häufigsten und am erfolgreichsten durchgeführte Gewebetransplantation beim Menschen. Für viele Millionen, die aufgrund von Hornhauterkrankungen erblindet sind, stellt sie die letzte Hoffnung zur Wiedererlangung der Sehkraft dar. Weltweit werden jedes Jahr über 100 000 Hornhauttransplantationen (=Keratoplastiken) durchgeführt (George et al., 2004). Bei unkomplizierten Keratoplastiken mit geringem Abstoßungsrisiko beträgt die Zweijahresüberlebensrate über 90% (Nieder Korn et al., 1990). Allerdings sinken die Überlebensraten von Hornhauttransplantaten stetig bis auf 46% über 15 Jahre nach der Transplantation (Williams et al., 2008). Bei Hochrisiko-Keratoplastiken in eine entzündete und/oder vaskularisierte Empfängerhornhaut fallen die Überlebensraten beträchtlich unter 50%, trotz topischer und systemischer Immunsuppression (Streilein, 1993). Die Transparenz einer Hornhaut und eines Hornhauttransplantates ist wesentlich von der funktionellen Integrität der kornealen Endothelzellen (CEC) abhängig. Aufgrund der nur sehr geringen proliferativen Eigenschaften ist ein Verlust oder ein Untergang der Zellen dieses Monolayers praktisch permanent und resultiert in einem Hornhautödem und in einer Reduktion der Sehkraft, bis hin zur funktionellen Erblindung (Patel et al., 2005). Es ist seit längerem bekannt, dass CEC während der Kultivierung von Spenderhornhäuten in Hornhautbanken untergehen. Vorzeitiger Zelluntergang durch Apoptose ist als Hauptursache des Endothelzellverlusts während der Hornhautkultivierung als auch nach –transplantation beschrieben (Schimmelpfenning, 1992; Waring et al., 1982; Murphy et al., 1984; Dobbins et al., 2000). In der Europäischen Union werden jährlich zirka 35000 Spenderhornhäute in Hornhautbanken kultiviert und auf die Eignung für eine Hornhauttransplantation untersucht, in den Vereinigten Staaten sind es zirka 100000. Allerdings verlieren bis zu 30% des Spendergewebes aufgrund der Kultivierung Endothelzellen in einem solchen Maße, dass diese Spenderhornhäute nicht mehr für reguläre Transplantationen verwendet werden dürfen und daher verworfen werden müssen. Diese Kenntnis apoptotischer Charakteristika der CEC kann daher Strategien zur Protektion der Endothelzellen während Lagerung und nach Transplantation eröffnen. Angesichts der wichtigen Bedeutung der CEC Viabilität für Hornhäute und -transplantate beschäftigt sich diese Arbeit mit der Untersuchung von Apoptose und anti-apoptotische Ansätzen zum Schutz dieser kritischen Zellschicht.

## I.1 Die Bedeutung des Hornhautendothels für die Sehkraft

Das Hornhautendothel ist ein 5-6 Mikrometer dicker Monolayer hexagonaler Zellen, welcher mit der azellulären Deszemetmembran verhaftet ist und in direktem Kontakt mit dem Kammerwasser der Augenvorderkammer steht. Die Hornhaut eines Neugeborenen verfügt über 300 000 – 500 000 Endothelzellen an der Rückfläche der Hornhaut, mit höherer Dichte in der Hornhautperipherie als im –zentrum (Ruusuvaara et al., 1988). Im Zuge des normalen Alterns nimmt die Zelldichte stetig ab, von 3500 – 4000 CEC /mm<sup>2</sup> bei einem Neugeborenen bis auf 1500 – 2500 CEC/mm<sup>2</sup> bei einem Erwachsenen hohen Alters (Vasara et al., 1999). Der mittlere, jährliche CEC Verlust wurde auf 0.56% berechnet, v.a. aufgrund der mangelnden Regenerationsfähigkeit zum Ersatz apoptotisch untergegangener Zellen (Hoffer, 1979).

Das Hornhautendothel hat zwei wesentliche Funktionen: Es ernährt die Hornhaut, indem es den Durchtritt des Kammerwassers in das Hornhautstroma ermöglicht, und es erhält die Hornhauttransparenz. Die Aufrechterhaltung der Klarheit wird durch die Pumpfunktion der Zellen gewährleistet. Sog. *tight junctions* (zonulae occludentes) zwischen den Zellen verhindern ein unkontrolliertes Einströmen von Kammerwasser in das Hornhautstroma. Zusätzlich zu dieser passiven Barriere pumpen die Endothelzellen aktiv Natrium, Kalium und Hydrogenkarbonat mit Hilfe ATP-abhängiger, enzymatisch-kontrollierter Ionenpumpen. Dadurch entsteht ein passiver Gradient, welchem Flüssigkeit aus dem Stroma zurück ins Kammerwasser folgt. Ist die Barriere- und/oder Pumpfunktion des Endothels beschädigt, fließt Kammerwasser in das Stroma und resultiert in einem (hauchigen) Hornhautödem (Vasara et al., 1999). Schädigung der CEC kann angeboren sein (z.B. Hornhautdystrophien), erworben (z.B. traumatisch) oder iatrogen (z.B. als Folge intraokularer Chirurgie). Daher sind die häufigsten Indikationen für eine Hornhauttransplantation eine bullöse Keratopathie nach Kataraktoperation (31.5%), gefolgt von der Fuchs Endotheldystrophie (23.2%) (n=4217; Dobbins et al., 2000) (siehe Abbildung 1, Quelle: Fuchsluger). Eine Eintrübung der Hornhaut erfordert den Ersatz des Hornhautendothels in Form einer perforierenden oder einer lamellären Hornhauttransplantation.



**Abbildung 1.** Hornhauttransplantat mit Abstoßungszeichen (Deszemetfalten, pigmentiertes Endothel, trübe Hornhaut [kleines Bild], Quelle: Reza Dana)

## **I.2 Die Rolle des Untergangs kornealer Endothelzellen bei Hornhauttransplantationen**

Langzeitnachsorgebeobachtungsstudien des Spendertransplantats geben wertvolle Erkenntnisse über die Auswirkungen der Transplantation auf die Integrität des endothelialen Monolayer. Ruusuvaara und Vasara verglichen die präoperativ von der Hornhautbank erhobenen Endothelzelldichte mit den postoperativen, am Patienten gemessenen Endothelzellichten. Diese Studie konnte nachweisen, dass 48% der CEC während einer mittleren postoperativen Follow-up Zeit von nur 11 Monaten verloren gingen (Ruusuvaara et al., 1988). Nach einer mittleren Follow-up Zeit von 20,5 Jahren in derselben Kohorte betrug der Endothelzellverlust  $62.9 \pm 7.5\%$  (Vasara et al., 1999). Diese Ergebnisse ergeben einen mittleren jährlichen Zellverlust von 0,75% nach dem ersten Transplantationsjahr. Die mittlere Endothelzelldichte nach 20 Jahre Follow-up betrug  $953.5 \pm 161.8$  CEC/mm<sup>2</sup>. Laut verschiedener Studien sind Hornhäute mit einer Endothelzelldichte von weniger als 300 Zellen/mm<sup>2</sup> nicht in der Lage, die Transparenz der Hornhaut aufrechtzuerhalten (Abbott et al., 1983). Ein Messwert zwischen 300 und 500 Zellen/mm<sup>2</sup> gilt daher als Schwellenwert für die minimale erforderliche Zelldichte zur Wahrung der Hornhauttransparenz (Patel et al., 2005). Bei 500 bis 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> liegt eine Hochrisikosituation hinsichtlich der Durchführung von intraokularer Chirurgie vor, wie beispielsweise einer Kataraktoperation nach Hornhauttransplantation (Schultz et al., 1985). Demzufolge haben Transplantate mit langem Follow-up eine sehr beschränkte Fähigkeit, die Transparenz der Hornhaut im Falle einer Verletzung oder eines Traumas, welche weiter die CEC-Dichte reduzieren, aufrechtzuerhalten.

Ähnliche Daten konnten für Transplantate mit einem Follow-up von 20 bis 35 Jahre erhoben werden (mittlere Dichte zwischen 701 und 924 Zellen/mm<sup>2</sup>). Diese mittleren Zelldichten waren allerdings interessanterweise nicht signifikant niedriger als jene gemessen nach einer Nachbeobachtungszeit von 10 bis 15 Jahren (Schultz et al., 1985; Wolf et al., 1999). Weiterhin entspricht der Zellverlust ein bis zwei Jahre nach der Transplantation der Dynamik des physiologischen, altersbedingten Endothelverlust (Leist et al., 1985). Auf diese Weise können die guten Langzeitergebnisse und die hohen Überlebensraten bei *low risk*-Transplantationen erklärt werden: Nach dem Untergang von CEC vergrößern sich die verbliebenen Zellen, um die durch den Zellverlust entstandenen Lücken der Deszemetmembran zu überdecken (Schultz et al., 1985). Sobald dieser initiale Reparaturvorgang (*remodelling*) abgeschlossen ist, nehmen die CEC eine zumeist hexagonale Form an. Nun ist kein wesentlicher Unterschied mehr bezüglich der Zellmorphologie zwischen den zentral und den peripher gelegenen Zellen erkennbar (Rowan et al., 1997). Unter Berücksichtigung einer Rate von 60% Endothelzellverlust bei Langzeitverlaufsbeobachtungen sollte eine Hornhaut vor der Transplantation (in der Hornhautbank) eine Endothelzelldichte von mindestens 2500 Zellen/mm<sup>2</sup> aufweisen. Dann ist bei unkompliziertem Verlauf nach zwanzig Jahren eine Dichte von 1000 Zellen/mm<sup>2</sup> zu erwarten.

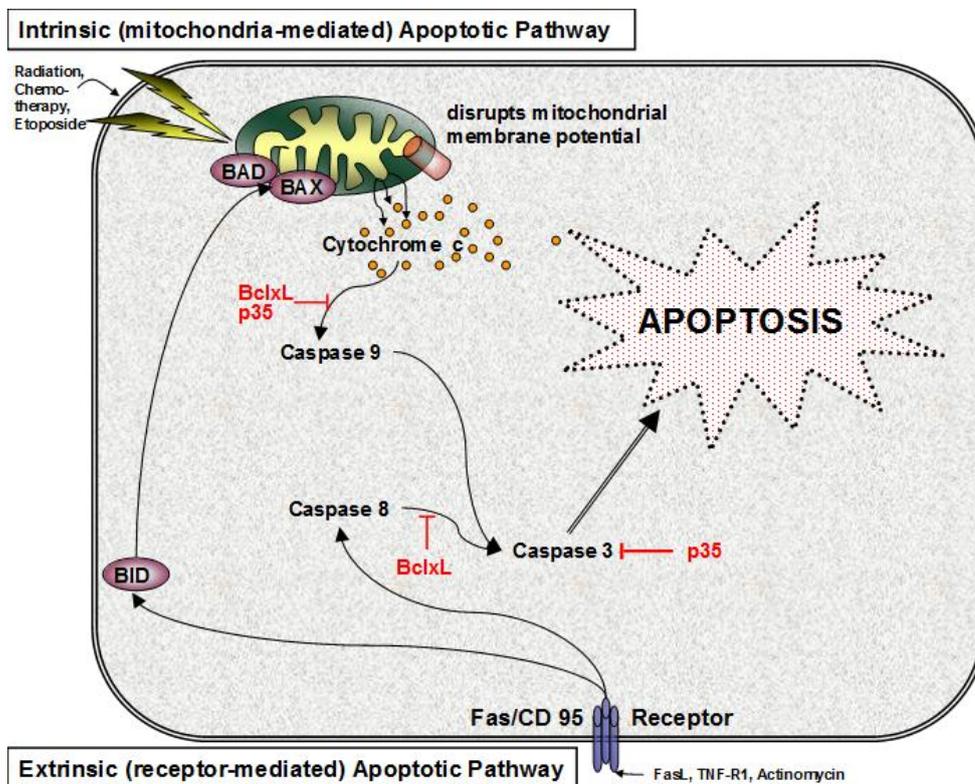
Die dem Endothelzellverlust zugrundeliegenden Mechanismen werden dem apoptotischen Zelluntergang zugeschrieben (Albon et al., 2000; Gain et al., 2002; Baringa et al., 1998; Crewe et al., 2001; Thornberry et al., 1998; Komuro et al., 1999). Daher wird sich diese Arbeit mit der Rolle der Apoptose bei normalem, altersabhängigem und pathologischem Zellverlust beschäftigen.

### **I.3 Die Bedeutung von Apoptose des Hornhautendothels**

#### **I.3.1 Apoptotische Mechanismen**

Apoptose ist ein morphologischer und zellbiologischer Begriff zur Abgrenzung des 'programmierten', nicht-inflammatorischen (im Sinne zeit- und ortsspezifisch) Zelltodes vom nekrotischen, inflammatorischen Zelluntergang. Zellbiologisch unterscheidet sich Apoptose von Nekrose u.a. durch Chromatinkondensation und

Zellschrumpfung, im Gegensatz zu Kern- und Zellschwellung (Hengartner et al., 2000; Tsujimoto, 2002; Adams et al., 1998; Deveraux et al., 1998). Apoptose verläuft über verschiedene, intrazelluläre Schritte, welche durch unterschiedliche Faktoren induziert werden können und in einen intrinsischen oder extrinsischen apoptotischen Signalweg münden (siehe Abbildung 2, Quelle: Fuchsluger): Der *intrinsische* Signalweg kann durch oxidativen Stress, Entzug von Wachstumsfaktoren oder DNA-Schädigung (z.B. durch Bestrahlung oder Chemotherapie) hervorgerufen werden und induziert das apoptotische Signal über die *Mitochondrien*. Der *extrinsische* Signalweg kann mittels einer Familie transmembranöser Proteine, sog. Todesrezeptoren (z.B., Fas, einem Mitglied der TNF Familie) initiiert werden. Sowohl ex- als auch intrinsischer Signalweg führen zu einer Fragmentierung der Zell-DNA, dem biochemischen Charakteristikum von Apoptose. Dies ist ein komplexer Prozess, welcher von einer Gruppe zysteinylaspartat-spezifischer Proteasen koordiniert wird, den *Caspasen* (Deveraux et al., 1998).

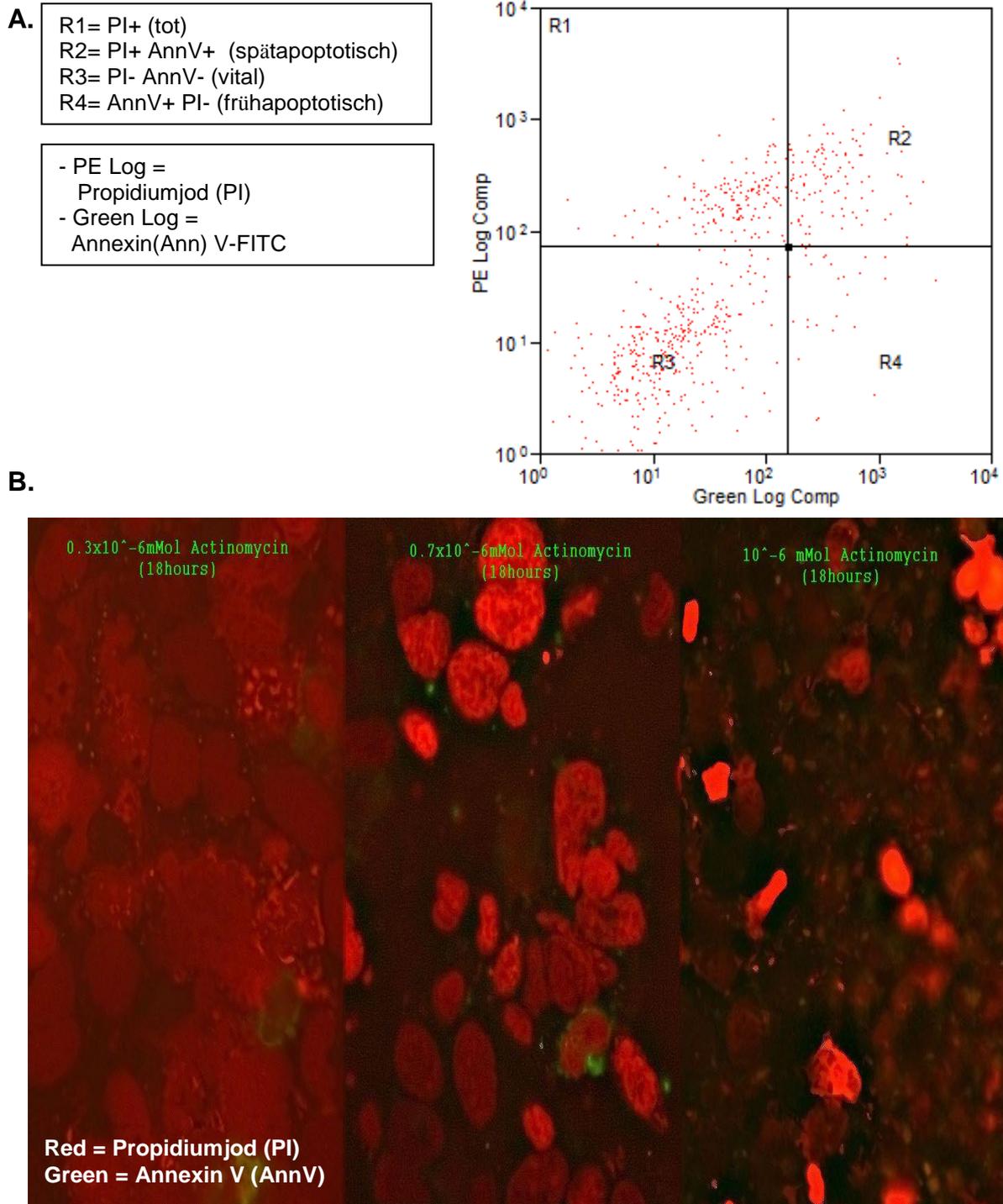


**Abbildung 2.** Schema zu in- und extrinsischen apoptotischen Signalwegen und den Interaktionen der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-xL, IAP, Survivin und p35 mit der Caspasekaskade (Quelle: Fuchsluger).

Die Regulierung der Caspasen, und der Apoptose, ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass der intrinsische Signalweg unter der Steuerung der großen Familie pro- und anti-apoptotischer Faktoren steht, die nahezu zwei Dutzend Mitglieder der bcl-2 Genfamilie umfasst (Clem, 2001). Die Balance zwischen pro-apoptotischen (z.B., Bax) und anti-apoptotischen (z.B., Bcl-xL und Bcl-2) Mitgliedern wird als Regler verstanden, welche die Zelle in Richtung Apoptose steuert oder sie vor ihr bewahrt (Beidler et al., 1995). Apoptose wird auch von anderen Proteingruppe beeinflusst, wie z.B. Survivin oder die *Inhibitor of Apoptosis* Proteine (*IAP*) (Robertson et al., 1997). Die Proteine der IAP Familie waren die zu allererst identifizierten, endogenen Caspaseinhibitoren. Sie wurde zuerst im Genom des Baculovirus entdeckt.

Apoptose kann mit Veränderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen, der freien Radikale und den Auswirkungen des oxidativen Stress assoziiert sein (Xue et al., 1995). Charakteristischerweise führt ein Anstieg des intrazellulärer Kalziumspiegel zu Apoptose in CEC. Dies hängt mit der Freisetzung von Kalzium aus den Mitochondrien und dem endoplasmatischem Retikulum zusammen (Xue et al., 1995). Zudem wirkt Kalzium als wichtiger *second messenger* für wichtige Signalwege. So spielt er eine wichtige Rolle in der Aktivierung der in den Apoptosesignalwegen involvierten Enzyme und hat Auswirkungen auf die Ionenkanäle der CEC Membran (Fadok et al., 1992; Mergler et al., 2005; Mergler et al., 2007; Clapham, 2007; Putney et al., 1993).

Eine apoptotische Zelle weist charakteristische Veränderungen der Zellmembran auf, welche mittels eines Fluoreszenzmikroskops, z.B. nach einer Annexin V-Färbung, unmittelbar detektierbar sind (Schimmelpfennig et al., 1982): Während der frühen Apoptose transloziert Phosphatidylserin in der Zellmembran von der zytosol- (nach innen) seitigen Ausrichtung nach aussen (Dahm, 1999). Mit fortschreitender Apoptose schrumpft der Zellkern, das Chromatin kondensiert, dann fragmentiert die DNA. Daher können die Stufen der Apoptose mittels Annexin V (AnnV) verfolgt werden, welches Phosphatidylserin an der Aussenseite der Zellmembran detektiert. Zudem dient Propidiumjod (PI) als Kernmarker. Vitale Zellen werden entsprechend als AnnV-PI- nachgewiesen, frühe Apoptose als AnnV+PI-, späte Apoptose als AnnV+PI+, untergegangene Zellen als PI+AnnV- (siehe Abb. 3, Quelle: Fuchsluger).



**Abbildung 3.** Nachweis von Apoptose bei humanen kornealen Endothelzellen (Quelle: Fuchsluger)

A. Frühe und späte Apoptose primärer humane korneale Endothelzellen nach Behandlung mit dem Apoptosetrigger Etoposid (für 120 Stunden).

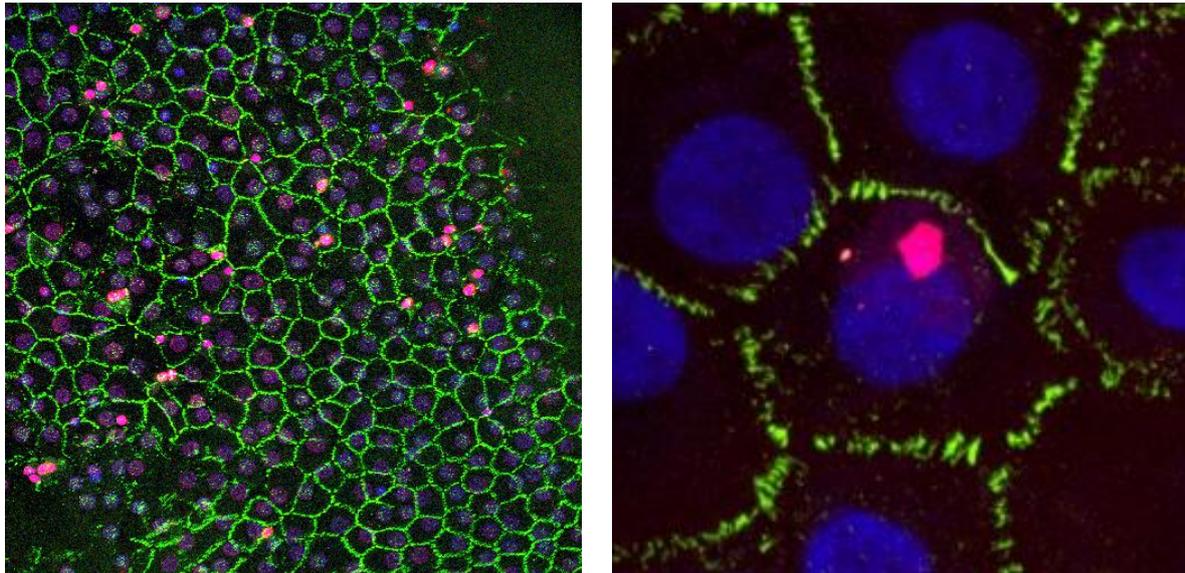
B. Vitale (AnnV- PI-), frühapoptotische (AnnV+ PI-), spätapoptotische/nekrotische (AnnV+ PI+) und tote (PI+) primäre humane korneale Endothelzellen behandelt mit dem Apoptosetrigger Aktinomycin D in verschiedenen Konzentrationen für 18 Stunden: Eine ansteigende Konzentration der Triggersubstanz resultiert in einer Abnahme der

frühapoptotische Zellpopulation und einem entsprechenden Anstieg der Population spätapoptotischer und toter Zellen.

### **I.3.2 Die Bedeutung von Apoptose in endogen und iatrogen hervorgerufenen Hornhautendothelpathologien**

Studien mit Hornhäuten außerhalb des Transplantationsmodells konnten nachweisen, dass Apoptose residenter Hornhautendothelzellen während kornealer Wundheilung stattfindet, wie während Epithelabschabungen oder refraktiver Chirurgie (Nagy, 1995; Kim et al., 2000; Helena et al., 2000). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl normale korneale Epithel-, als auch Endothelzellen den Todeszellrezeptor Fas exprimieren. Dieser ist zudem auch im Stroma nachweisbar. Nach experimenteller Hornhautverletzung kann Fas-vermittelte Apoptose zeitnah durch *TdT-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL)* nachgewiesen werden (Abbildung 4, Quelle: Fuchsluger) (Kim et al., 2000). Weiterhin konnte demonstriert werden, dass Fas-vermittelte Apoptose in stromalen Zellen durch Interleukin-1 verstärkt wird. Dies zeigt, dass Liganden an Fas (FasL) nicht die alleinigen Mediator von Apoptose in der Kornea sind (Helm et al., 2000).

Zusätzlich zu entzündlichen und traumatischen Schädigungen der Hornhaut gibt es auch gesicherte Daten, dass Apoptose eine wichtige Rolle bei dem oftmals (und klinisch wichtigen) beobachteten Verlust von Endothelzellen nach Kataraktchirurgie spielt. Dies ist insbesondere bedeutsam vor dem Hintergrund, dass die Kataraktoperation die weltweit am häufigsten durchgeführte Operation darstellt (Olsen et al., 1980). Dieser durch Apoptose bedingte Endothelzellverlust ist die führende Ursache für Hornhautdekomensationen und eine der Hauptdiagnosen für die Indikationsstellung einer Hornhauttransplantation. Endothelzellenuntergang durch Apoptose ist ein weit verbreiteter Vorgang in vielen pathologischen Prozessen unterschiedlicher Ätiologien (selbst nicht-chirurgisch/transplantationsunabhängig), und daher ein wichtiger Angriffspunkt zur Beeinflussung der Reaktion eines Gewebes auf Verletzung.



**Abbildung 4.** Detektion der DNA Fragmentierung, einem Zeichen später Apoptose, mittels *TdT-mediated dUTP nick-end labelling (TUNEL)*. [humanes korneales Endothel, grün = ZO-1-AB (ZO=zonula occludens), blau = Nuklei, To-Pro3 Färbung, rot = TUNEL] (Quelle: Fuchsluger)

### **I.3.3 Der Untergang des Hornhautendothels bei Hornhauttransplantatversagen**

Untersuchungen in unterschiedlichen Organtransplantationsmodellen zeigten, dass die destruktive Wirkung von Leukozyten auf das Transplantat im Wesentlichen durch entzündliche Zytokine hervorgerufen wird (z.B. durch Interleukin-1beta (IL-1beta) und den Tumor Nekrose Factor-alpha (TNF- $\alpha$ )). Diese wirken bei der Bildung freier Radikale, von Stickstoffmonoxid, zusammen und induzieren durch die Aktivierung pro-apoptotischer, caspaseabhängiger Signalwege Apoptose in den Zielzellen (Lai et al., 2001; Li et al., 2001). Darüberhinaus spielt Apoptose des Hornhautendothels eine wichtige Rolle bei der akuten Transplantatabstoßung (Borderie et al., 2000), ähnlich jener Daten, welche Zelluntergang nach Transplantation selbst ohne offensichtliche Entzündung nachgewiesen haben (Zhu et al., 1999; Heemann et al., 1994). Da eine hostile Mikroumgebung, z.B. bedingt durch eine immunogene Entzündung, ebenfalls Zelluntergang bedingt, kann Apoptose (insbesondere der Hornhautendothelzellen) der gemeinsame Nenner von Hornhauttransplantatdekomensation/-versagen unterschiedlicher Ursache sein, unabhängig der Ursache (Immunreaktion, postoperativ unkontrollierbar hoher Augeninnendruck, verlängerte Operationsdauer, komplizierte Operation etc.) (Heemann et al., 1994).

Die Schlüsselrolle von Apoptose bezüglich des langsamen, chronischen Verlusts vitalen, transplantierten Gewebes wird zunehmend durch Daten verschiedener Organ- und Gewebetransplantatsmodelle unterstützt (Zhu et al., 1991; Bourges et al., 2007). Bei Hornhauttransplantationen wird die Korrelation zwischen Untergang der CEC und Transplantatversagen indirekt durch die Beobachtung unterstützt, dass die Wahrscheinlichkeit der Transplantatüberlebens mit abnehmender Endothelzellichte sinkt. Vor diesem Hintergrund ist es wichtig, dass Hornhäute selbst während der Hornhautkultivierung vor einer Transplantation Endothelzellen verlieren (Lutz et al., 2003; Bell et al., 2000). Daher rührt die Einschätzung von Hornhautchirurgen, dass das postoperative Transplantatüberlebens umso höher ist, je frischer eine Hornhaut ist (und somit typischerweise die Endothelzellichte höher). Veränderungen der CEC Morphologie (Form oder Grösse der Zellen) oder deren Dichte dienen als sehr sensitive Indikatoren einer frühen Transplantatbeeinträchtigung. Daher ermöglicht eine regelmässige, postoperative Untersuchung des Hornhautendothels mittels Konfokal- oder Interferenzmikroskop die frühzeitige Detektion einer Transplantatbeeinträchtigung auf zellulärer Ebene. Dies erlaubt dann eine frühe therapeutische Intervention.

#### **I.3.4 Die Bedeutung von Endothelzellverlust hinsichtlich der Qualität von Spenderhornhäuten im Rahmen der Hornhautkultivierung**

Aufgrund unterschiedlicher Verfahrensweisen in der Historie unterscheiden sich die Kultivierungsbedingungen von Spenderhornhäuten in Hornhautbanken in Europa von jenen in Nordamerika, Asien oder Australien. Nach der Publikation von Summerlin über die Kultivierung von Spenderhornhäuten unter Bedingungen der Organkultur im Jahre 1973, verbreitete sich diese Kultivierungsmethode in Europa und wird nun dort von nahezu jeder Hornhautbank verwendet (Summerlin et al., 1973). Im Folgejahr publizierte McCarey in den Vereinigten Staaten das erste Medium für eine Kultivierung von Hornhäuten bei +4 °C über 48 Stunden (McCarey et al., 1974). Weitere Arbeiten führten zur Entwicklung des Kultivierungsmediums Optisol<sup>®</sup> und Optisol-GS<sup>®</sup> (Bausch & Lomb, 9342 Jeronimo Road, Irvine, CA 92718, U.S.A.), welches zum Standardmedium der Hornhautbanken in Nordamerika, Australien, Neuseeland, Japan und Korea avancierte.

Gemäß der Bedingungen der Organkultur kann eine Hornhaut bei einer Temperatur von 31-37°C für höchstens 7 Wochen kultiviert werden (Ehlers et al., 1999). Wie jährlich von der "European Eye Bank Association" (20<sup>th</sup> Edition, 2012) berichtet, werden in deren Mitgliedsbanken in Europa jedes Jahr zwischen 30000 und 35000 Spenderhornhäute kultiviert. 20-30% müssen aufgrund von Endotheldegenerationen verworfen werden (reduzierte Endothelzellviabilität oder reduzierte CEC-Dichte, unter das zugelassene Minimum, 20th Edition, 2012). Angesichts dieser und der während der vergangenen Jahre berichteten Daten (Jones et al., 2009) beträgt die Anzahl der wegen Endothelzelldegradation verworfener Hornhäute im Mittel aller Hornhautbanken zirka 30% aller kultivierten Hornhäute. Apoptose von CEC spielt hier angesichts der mit steigender Kultivierungsdauer absinkenden CEC-Dichte eine zentrale Rolle (Armitage et al., 1997) (siehe Absatz unten). Bei Verwendung des Optisol-GS<sup>®</sup> Kulturmediums ist eine hypotherme Kultivierung der Spenderhornhäute von bis zu 14 Tagen zulässig (Bausch & Lomb Produktinformation). Der mittlere Endothelzellverlust bei Kultivierung in Optisol-GS<sup>®</sup> über 21 Tage betrug 16% (Means et al., 1995).

Die Allotransplantation von Spenderhornhäuten ist für durch Hornhautpathologien visuell beeinträchtigte Patienten zumeist die einzige Möglichkeit, ihre Sehkraft wieder zu verbessern. Zudem ist angesichts des zunehmenden Alters der Gesellschaft und der steigenden Anzahl an Kataraktoperationen mit einem Anstieg transplantationsbedürftiger Endothelpathologien zu rechnen. Vor diesem Hintergrund führte die Protektion des Endothels vor Apoptose zu einer höheren Anzahl der für eine Transplantation verfügbaren Spenderhornhäute. Angesichts des in vielen Ländern vorherrschenden Transplantatmangels könnte so bestehende Wartelisten reduziert werden.

### **I.3.5 Zusammenhang zwischen Kultivierung und Apoptose des Hornhautendothels**

Apoptose und Nekrose des Endothels von Spenderhornhäuten wird nur von wenigen experimentellen Studien untersucht. Ein wesentlicher Aspekt hierbei ist, wie Apoptose gemessen wurde: Späte Apoptose wurde in organkultivierten

Spenderhornhäuten mittels TUNEL und der immunhistochemischen Detektion der Caspase 3-Aktivität quantifiziert. Diese Ergebnisse wurden durch charakteristische morphologischer Veränderungen der apoptotischen Zellkerne (Kondensation des Chromatins, Blasenbildung des Kerns, Hoechst 33345 Färbung) bestätigt. Anzahl und Verteilung TUNEL positiver CEC zeigte eine enge Korrelation zu Faltenbildung der Deszemetmembran und der generellen Qualität des Endothels. Dennoch bestand keine signifikante Korrelation zwischen *später* Apoptose und der Kultivierungsdauer. Darüberhinaus korrelierte Apoptose von CEC nicht mit den Todesursachen der Spender, der Zeitspanne zwischen Eintritt des Todes und der Enukleation oder der Zeitspanne zwischen Tod und Inkulturnahme der Spenderhornhaut (Murphy et al., 1984). Daten anderer beschreiben 12.7% TUNEL-positive CEC bei Spenderhornhäuten in Organkultur zwischen 3 bis 35 Tagen. Nur wenige TUNEL positive CEC zeigten auch einen gänzlich fragmentierten Nukleus, charakteristisch für *späte* Apoptose (Waring et al., 1982). Caspase 3 Färbung kann zur Untersuchung früher CEC-Apoptose verwendet werden. Caspase 3 wurde als Initiator der CEC-Apoptose beschrieben (Armitage et al., 1997). Caspase 3 positive CEC wurden selten detektiert, v.a. in Hornhäuten, welche länger als 28 Tagen in Kultur waren oder auch bei jenen, die mehr als fünf Tagen in entquellendem dextranhaltigem Medium lagerten (Means et al., 1995). Apoptotische Zellen werden innerhalb von 30 bis 60 Minuten vollständig durch Phagozytose entfernt (Albon et al., 2000). Daher ist die rechtzeitige Detektion apoptotischer Zellen vor der phagozytotischen Verschwinden eine zentrale Herausforderung. Komuro und Bourne berichten von  $8 \pm 20\%$  TUNEL positiver CEC in bei  $4^{\circ}$  C kultivierten Spenderhornhäuten. Sie beschrieben einen signifikanten Zusammenhang mit TUNEL-positiven Stromazellen, allerdings nicht mit der Kultivierungsdauer (Komuro et al., 1999). Sowohl Apoptose- als als Nekrose-bedingter Zelluntergang wurde bei diesen hypotherm kultivierten Hornhäuten beobachtet, wobei apoptotischer CEC-Untergang dominiert (Komuro et al., 1999).

### **I.3.6 Die Bedeutung des Hornhautmetabolismus während der Hornhautkultivierung**

Der Metabolismus der CEC spielt eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung von Apoptose des Hornhautendothels. Der Hornhautmetabolismus besteht im

Wesentlichen aus Glukose-verbrauchenden Prozessen wie der Glykolyse und dem Pentosephosphatweg. CEC nehmen Glukose aus dem Kammerwasser auf. Dies geschieht sowohl durch einen Gradienten in Richtung Hornhautepithel (Gain et al., 2002), als auch über einen aktiven Transport in die Zellen (Baring, 1998). Durch Messungen der Konzentrationen von Glukose, Laktat, ATP und ADP zu verschiedenen Zeitpunkten im Medium von Spenderhornhäuten in Organkultur ist bekannt, dass die kultivierten Hornhäute v.a. während der ersten beiden Wochen einen reduzierten Metabolismus aufweisen. ATP-, ADP- und Laktatkonzentrationen stiegen während dieser Zeit an, während die Glukosekonzentration abfiel (Crewe et al., 2001). Thornberry beschreibt einen deutlichen Abfall der Glukosekonzentration während der ersten beiden Wochen der Hornhautkultivierung in Organkultur (Thornberry et al., 1998). Ein enger Zusammenhang zwischen Metabolismus und Apoptose konnte durch den protektiven Effekt der FGF-2 Supplementierung des Hornhautmediums gezeigt werden, in deren Folge eine signifikant geringere CEC-Apoptoserate auftrat (Rieck et al., 2003).

### **I.3.7 Neue Ansätze: Gentherapie zum Schutz kornealer Endothelzellen vor Zelluntergang**

Die Möglichkeit, das Hornhautendothel vor verfrühtem Zelluntergang zu schützen, hätte signifikante Auswirkungen, Endothelzellverlust und die damit verbundene Trübung der Hornhaut zu verhindern. Die Auswirkungen auf die Hornhautkultivierung wären angesichts der hohen Anzahl der aufgrund von Endotheluntergang verworfenen Spenderhornhäute beträchtlich. Folglich wären mehr Spenderhornhäute für Transplantationen verfügbar (siehe Abbildung 5, Quelle: Dana, Fuchsluger).

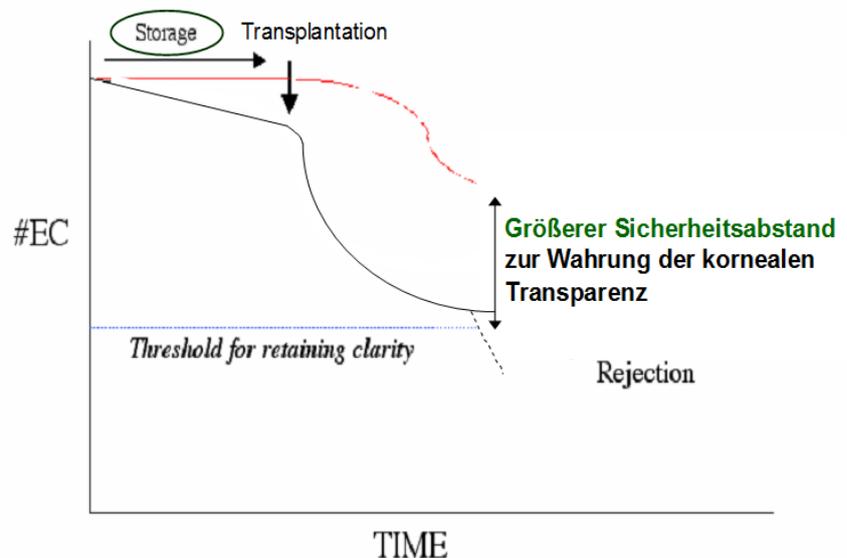
Insbesondere die Hornhaut ist für gentherapeutische Ansätze geeignet, aus verschiedenen Gründen: Im Gegensatz zu parenchymatösen Organen kann die Hornhaut über mehrere Wochen kultiviert werden, was Zeit für eine gentherapeutische Anwendung vor der Transplantation ermöglicht. Weiterhin erlaubt die Transparenz der Hornhaut die direkte Visualisierung eventueller mikro- und makroskopischen Veränderungen nach Gentransfer. Hornhautendothelzellen sind direkt zugänglich, da sie in direktem Kontakt mit dem Kulturmedium und daher für Gentransfer einfach erreichbar sind. Transgene Expression ist in den meisten

Organen zudem transient, da sie durch die zelluläre Immunantwort gegen die transduzierten Zellen, gegen virale Protein und gegen das fremde, transgene Protein gerichtet ist (Buchsacher et al., 2000; Komuro et al., 1999; Reim et al., 1967).

Wie bereits im Mausmodell der Hornhauttransplantation gezeigt werden konnte, schützt Bcl-xL murine CEC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Barcia et al., 2007). In diesem Falle wurden Lentiviren zur Einschleusung des anti-apoptotischen Gens in die CEC verwendet. Ebenso konnten mehrere Gruppen nachweisen, dass adenovirale Vektoren zu einer effizienten Einschleusung von Genen führen. Im Gegensatz zu lentiviralen Vektoren riefen diese Vektoren allerdings schädigende Immunreaktionen hervor, so dass sie für eine *ex vivo* Transfektion von Hornhäuten ungeeignet scheinen (Pleyer et al., 2001; Grieger et al., 2005). Folglich sind virale Vektoren wie Lentiviren oder adeno-assoziierte Vektoren, welche ein geringe Immunogenität aufweisen, die besten Optionen für einen Gentransfer in CEC (Beutelspacher et al., 2005; Beutelspacher et al., 2006). Getherapie scheint ein vielversprechender Weg für eine Verbesserung des Überlebens von Hornhauttransplantaten zu sein (Hudde et al., 1999; Rayne et al., 2001; Ritter et al., 2005; Williams et al., 2004; Williams et al., 2008). Diese Arbeit zielte auf die Entwicklung eines Ansatzes zur Vermeidung von Endothelzelluntergang in Spenderhornhäuten, welcher aus dem Labor in die klinische Anwendung überführt werden könnte.

**Abbildung 5.**

Konzeptionelle Abbildung zur Veranschaulichung der Rolle apoptotischen Endothelzelluntergangs vor und nach Hornhauttransplantation (Quelle: Dana, Fuchsluger; y-Achse = Anzahl der vitalen Endothelzellen; x-Achse = Zeit). Hornhäute benötigen eine minimale



Anzahl vitaler Endothelzellen (CEC) zur Aufrechterhaltung der Transparenz (Schwelle). Die Anzahl der CEC vermindert sich physiologischerweise über die Zeit (schwarze Linie), sowohl während der Kultivierung als auch nach Transplantation (vertikaler Pfeil), mit plötzlichem Abfall bei immunbedingter Abstossung (gestrichelte Linie). Die Hypothese ist, dass die Verminderung von Apoptose (dargestellt in rot) die Kurve nach rechts verschieben wird, und sich so das Risiko verringert, dass die CEC-Dichte unterhalb der minimalen Schwelle zur Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz fällt (rote Kurve).

## **II. Ziele der Studie, Fragestellungen, Hypothese**

Angesichts der besonderen Bedeutung der Apoptose kornealer Endothelzellen nach Kataraktchirurgie, während der Kultivierung von Spenderhornhäuten als auch nach Transplantation, waren die Ziele dieser Arbeit, das Potential anti-apoptotischen Transfers verschiedener Gene zum Schutz dieses minimal proliferativen Zelltyps vor vorzeitigem Zelluntergang zu ermitteln. Zur Stützung der Hypothese, dass CEC durch Überexpression anti-apoptotischer Proteine vor vorzeitigem Zelltod geschützt werden können, wurde Apoptose mittels Apoptose auslösenden Substanzen sowie Zellverlust während der Kultivierung von Hornhäuten untersucht. Eine Bestätigung der Hypothese könnte als Grundlage für spätere Gentherapieansätze zur Steigerung der Verfügbarkeit von Spenderhornhäuten dienen. Dies würde die Versorgung von Patienten in Ländern, die bisher unter Transplantatmangel leiden, ermöglichen und Transplantatversagen nach Hornhautchirurgie reduzieren, was weiterhin das Risiko von Re-Transplantationen senken würde.

### **III. Materialien and Methoden**

#### **III.1 Hervorrufen von Apoptose und von Zellverlust**

Apoptose wurde durch den Topoisomerase II Inhibitor Etoposid (intrinsischer apoptotischer Signalweg (Puthalakath et al., 2002)) und durch die anti-neoplastischen Wirkstoff Aktinomyzin D hervorgerufen, um vorzeitigen Zelluntergang über den extrinsischen apoptotischen Signalweg zu induzieren (Sattler et al., 1997). Sog. Forschungshornhäute, welche gutes Endothel aufwiesen, aber für eine Transplantation ungeeignet waren (n=17), wurden ebenso verwendet wie immortalisierte und primäre korneale Endothelzellen.

Die Kultivierung der Hornhäute wurde von den *standard operating procedures* und der *good laboratory practice*, veröffentlicht durch die *Eye Bank Association of America (EBAA)* sowie durch die *European Eye Bank Association (EEBA)* adaptiert (Pels et al, 2008; Pels et al, 2009; Goren, 2006). Hornhäute wurden von Hornhautbanken bezogen und unter den Bedingungen der Organkultur (37°C, Biochrome Cornea Medium I<sup>®</sup>, Berlin, Germany) oder unter hypothermen Bedingungen (4°C, Optisol-GS<sup>®</sup> Bausch & Lomb, Rochester, NY, USA) kultiviert. Sowohl die verwendeten Kulturmedien als auch die Protokolle sind weltweit weit verbreitet, international etabliert und entsprechen den gegenwärtigen Standards von Hornhautbanken. Zur Beschleunigung des Untergangs von CEC wurden diese Kulturmedien mit Ca<sup>2+</sup>-negativen PBS in einem Verhältnis von 1:1, 1:4 oder 1:10 (Organkultur) oder 1:1 oder 1:10 (hypotherme Kultivierung) verdünnt. Je nach Stärke der Verdünnung wurden die Hornhäute zwischen 9 Tagen und 11 Wochen kultiviert und alle 72 Stunden oder jeder Woche evaluiert (Tabelle, n=22).

Kultivierungsmethode	Verdünnung Medium : PBS	Hornhautpaare / in gleiche Teile geteilte Hornhäute	Dauer der Kultivierung	Nach- beobachtungs- zeitraum	Anzahl der analy- sierten Gesichts- felder
Organkultur	1:10	Paare	9 Tage	72 Stunden	8 pro HH
(37°C)	1:1	Paare	7 Wochen	wöchentlich	8 pro HH
	1:4	eine HH (5 Teile)	5 Wochen	wöchentlich	3 pro Teil, insg. 15
	1:1	eine HH (5 Teile)	5 Wochen	wöchentlich	3 pro Teil, insg. 15
	reines PBS	eine HH (5 Teile)	1 Wochen	täglich	3 pro Teil, insg. 15
hypotherm	1:10	eine HH (5 Teile)	12 Tage	72 Stunden	3 pro Teil, insg. 15
(4°C)	1:1	eine HH (5 Teile)	11 Wochen	wöchentlich	3 pro Teil, insg. 15

Tabelle: Überblick über die Kultivierungsexperimente

### III.2 Detektion und Messung von Apoptose

Apoptose wurde durch die Detektion der Translokation von Phosphatidylserin auf die äußere Seite der Zellmembran gemessen. Annexin V (AnnV) ist ein Mitglied der phosphatidyl-bindenden Proteine mit starker Affinität zu Phosphatidylserin. Die Gegenfärbung, Propidiumjod (PI), wird zur Untersuchung der Zellmembranpermeabilität (Lyse) verwendet. Entsprechend sind vitale Zellpopulationen nichtfluoreszent, frühapoptotische Zellen färben sich mit Annexin V an, nicht aber für PI. Spätapoptotische Zellen treten ggf. in Nekrose über, wenn sie

nicht durch Phagozytose entfernt werden. Diese Populationen binden sowohl Annexin V als auch Propidiumjod, während alleinige PI-Färbung schließlich auf Nekrose hinweist.

Apoptose humaner CEC, hervorgerufen durch den in- oder extrinsischen Apoptoseweg, wurde mittels Annexin V-FITC und PI in der Durchflusszytometrie quantifiziert (gemäß der Herstelleranleitungen, ApopNexin FITC Apoptosis Detection Kit, Millipore, Temecula, CA, USA). Apoptose in CEC, welche anti-apoptotische Proteine oder IZsGreen überexprimierten, wurde mittels Annexin V-PE und 7-AAD (Annexin V-PE Apoptosis Detection Kit I, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) nachgewiesen. Dieses Vorgehen erlaubte die gleichzeitige Detektion IZsGreen-exprimierender CEC und von AnnV / PI im Durchflusszytometer (BD LSRII SORP, Software: Summit).

Bei Hornhäuten wurde Annexin V - Cy5 (Biovision, Mountain View, CA, USA) zur Detektion der Apoptose im Konfokalmikroskop verwendet, die Analyse der Antikörperexpression erfolgte mittels Pixelquantifikation (Adobe Photoshop®). Zudem wurde ein *terminal deoxyribonucleotidyl-transferase (TdT)-mediated deoxyuridine-5'-triphosphate-digoxigenin (dUTP) nick-end labeling (TUNEL)* Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) entsprechend der Herstelleranleitung zur Detektion und Messung der DNA Brüche in CEC von Hornhäuten verwendet. Vitale Zellkerne wurden mit To-Pro 3 Jod (Invitrogen, Eugene OR, USA) visualisiert. Zellmembranen wurden mit Hilfe des Kaninchen anti-ZO-1 Markers (N-term) dargestellt (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Die Hornhäute wurden gewaschen und mit Vectashield Fluoreszenzmedium beschichtet (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Expression von IZsGreen sowie die TUNEL Positivität wurden an einem konfokalen Mikroskop des Typs Leica TSC-SP2 untersucht (40X).

### **III.3 Lentivirales Expressionssystem**

Die cDNA des anti-apoptotischen Proteins Bcl-xL oder des baculoviralen anti-apoptotischen Molekül p35 wurden jeweils in den lentiviralen Vektor pHAGE-CMV-MCS-IZsGreen subkloniert (Harvard Gene Therapy Initiative (HGTI)). Beide Gene

wurden unabhängig voneinander in einen Polylinker (multiple Klonierungsstelle) des Vektors kloniert, vor welcher sich eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und die Kodierungssequenz für das grün fluoreszierende Protein IZsGreen (gewonnen aus Riffkorallen) befand. Die IRES-Sequenz erlaubte die Öffnung von zwei Leserastern in einer mRNA. Sowohl lenti-IzsGreen (Kontrollvirus) als auch lenti-IzsGreen-bclxL und lenti-IzsGreen-p35 waren replikationsinkompetent, so dass die infizierten Zellen keinen Virus produzieren konnten.

### **III.4 Gentransfer in korneale Endothelzellen**

#### **Gentransfer in korneale Endothelzellen zur Verhinderung *triggervermittelter Apoptose***

Der Gentransfer in primäre oder immortalisierte CEC wurde mittels pHAGE-CMV-MCS-IzsGreenW, pHAGE-CMV-IzsGreen-BclxLW oder pHAGE-CMV-IzsGreen-p35W ( $3 \times 10^5$  IU/ml) bei Konfluenz der Zellen durchgeführt. Um Spenderhornhaut-abhängige Schwankungen auszuschließen, wurde die Transduktion der CEC an einzelnen Hornhäuten durchgeführt, welche in verschiedene, gleichgroße Stücke geteilt wurden. Entsprechend diente ein Stück als unbehandelte Kontrolle, das zweite wurde mit pHAGE-CMV-MCS-IzsGreenW als Kontrollvektor, der für ein Markergen kodiert, transfiziert ( $3 \times 10^5$  IU/ml), das dritte mit pHAGE-CMV-IzsGreen-BclxLW ( $3 \times 10^5$  IU/ml), das vierte schließlich mit pHAGE-CMV-IzsGreen-p35W ( $3 \times 10^5$  IU/ml). Bei Untersuchungen zum Einfluß des Titers auf den Schutz von CEC gegen Apoptose, wurde ein weiteres mit  $1.2 \times 10^8$  IU/ml pHAGE-CMV-IzsGreen-BclxLW transfiziert.

Hornhäute wurden bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Stunde mit dem jeweiligen Gen in Biochrome Cornea Culture Medium I mit  $8\mu\text{g/ml}$  Polybren (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Virusbestandteile wurden die Hornhäute vor der Kultivierung im jeweiligen Kulturmedium mit sterilem PBS gründlich abgewaschen.

#### **Gentransfer in Hornhäute bei *Kultivierungsexperimenten***

Gentransfer in Hornhäute wurde entweder an intakten Hornhäuten oder an einzelnen Stücken jeweils einer einzigen Hornhaut durchgeführt: Um spenderabhängige

Schwankungen auszuschließen, wurden Experimente an einzelnen Hornhäuten durchgeführt, welche jeweils in fünf Stücke geteilt wurden. Eines diente als unbehandelte Kontrolle, eines wurde mit pHAGE-CMV-MCS-IZsGreenW (Kontrollvektor,  $3 \times 10^5$  IU/ml), eines mit pHAGE-CMV-IZsGreenW-bclxL ( $3 \times 10^5$  IU/ml) und eines mit pHAGE-CMV-IZsGreenW-p35 ( $3 \times 10^5$  IU/ml) transfiziert. Zur Untersuchung der Auswirkungen des Titers auf eine Protektion der CEC gegen Zellverlust oder Apoptose, wurde ein fünftes Stück mit pHAGE-CMV-IZsGreenW-Bcl-xL unter Verwendung des Titers  $1.2 \times 10^8$  IU/ml transfiziert. Zudem wurden Experimente an intakten Hornhautpaaren desselben Spenders durchgeführt, um Bedingungen wie in einer Hornhautbank zu simulieren. Hornhäute dieser Hornhautpaare wurden mit dem Kontrollvektor pHAGE-CMV-MCS-IZsGreenW oder dem jeweiligen Gen des Interesses transfiziert (jeweils  $3 \times 10^5$  IU/ml).

Intakte Hornhäute oder Hornhautstücke wurden jeweils mit dem Gen für IZsGreen allein oder mit dem funktionellen Gen bei  $37^\circ\text{C}$  für eine Stunde in Biochrome Cornea Culture Medium I und  $8\mu\text{g/ml}$  Polybren inkubiert. Zur Entfernung überschüssigen Virus erfolgte eine Spülung mit sterilem PBS jeweils vor Kultivierung im entsprechenden Medium.

### **III.5 Detektion der transgenen Expression, Messung von Apoptose**

Bei endothelialen Zellsuspensionen wurde die transgene Expression des Reporterproteins mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Überexpression von IZsGreen in kultivierten Hornhäuten wurde jeweils einen Tag nach Inkubation der jeweiligen CEC mit dem jeweiligen Vektoren für 0h (Kontrolle), 1h, 6h und 24h bei  $37^\circ$  gemessen (jeweils eine in gleiche Anteile geteilte Hornhaut, eine Stunde Transduktionszeit). Zudem wurde Apoptose mittels TUNEL Assay (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Vorgaben des Herstellers bestimmt. Vitale Zellkerne wurden mit Hilfe von To-Pro 3 Jod (Invitrogen, Eugene OR, USA), Zellmembranen mittels Kaninchen anti-ZO-1 (N term) (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) visualisiert. Hornhäute wurden gewaschen und mit Vectashield Fluoreszenzmedium beschichtet (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Die Überexpression von IZsGreenW sowie TUNEL-Positivität wurde mit Hilfe des Konfokalmikroskops Leica TSC-SP2 (40X) untersucht.

### **III.6 Kultivierung kornealer Endothelzellsuspensionen und von Hornhäuten**

Die verwendete humane korneale Endothelzelllinie wurde freundlicherweise von Frau Prof. K. Engelmann (Klinikum Chemnitz) zur Verfügung gestellt. Es wurden jeweils 100000 Zellen in jede Kulturschale einer 48 well-Kulturplatte (jeweils drei wells) ausplattiert. Die Zellen wurden in MEM-Medium mit 5% fötalem Kälberserum (FCS) und 0.5% Gentamycin (Sigma, St. Louis, MO, USA, G1272) kultiviert. Vor der Transfektion wurden die immortalisierten CEC einmalig mit Mitomycin C behandelt, um die Zellproliferation zu stoppen. Die Zellen wurden anschließend gründlich mit sterilem PBS gewaschen. Die Anzahl der Zellen in jeder Kulturschale einer 48 well-Platte betrug  $0.154427 \pm 0.29055 \times 10^6$  CEC.

Primäre CEC wurden von einer Spenderhornhaut gewonnen und gemäß eines Protokolls von Joyce et al. in Medium kultiviert, welches fötales Kälberserum, endothelialen Wachstumsfaktor (EGF), Nervenwachstumsfaktor (NGF) und Extrakt der bovinen Hypophyse enthielt (Joyce et al., 2004). Alle durchflusszytometrischen Experimente mit primären Zellen verwendeten Zellen der Passage 8 desselben Zelltyps.

Zwölf Hornhäute mit intaktem Endothel, aber gemäß der Hornhautbankvorgaben aufgrund anderer Kriterien für eine Transplantation ungeeignet, wurde von Tissue Banks International, Baltimore, MD, USA, und vom Lions Eye Research Institute, Tampa, FL, USA, bezogen. Die Hornhäute wurden bei 37°C in Biochrome Cornea Culture Medium I (Biochrome, Berlin) nach Zusatz von 2% FCS kultiviert.

### **III.7 Detektion des Verlusts kornealer Endothelzellen und Bestimmung der Endothelzellmorphologie**

CEC wurden mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops dargestellt (Nikon Eclipse TE-2000S:0X, Brightfield Modus), einem Mikroskop, welches auch in Hornhautbanken, z.B. in Deutschland, verwendet wird. Die Zählung der CEC sowie die Analyse der Hexagonalität erfolgte mittels einer in Deutschland zugelassenen und verbreiteten Hornhautbanksoftware, welche automatisiert Zelldichten sowie Variation der Zellform ermittelt (Endothelium Analysis Tool, Rhine-Tec GmbH, Krefeld). Um repräsentative Daten zu erhalten, wurden in jedem Hornhautstück

(geteilte Hornhäute) jeweils drei Gesichtsfelder untersucht und analysiert. Bei den Versuchen mit ungeteilten, intakten Hornhäuten wurden insgesamt acht Gesichtsfelder untersucht und analysiert (zwei im Zentrum, drei in der mittleren Peripherie, drei in der Peripherie der Hornhaut). Die Untersuchungen der kultivierten Hornhäute wurde entweder alle drei Tage (1:10 Verdünnungen Medium:PBS) oder jede Woche durchgeführt (1:4, 1:1 Verdünnungen Medium:PBS). Zusätzlich zu den Parametern konnten bestimmte Phasen des Endothelzellverlusts durch Vergleich der jeweiligen Bilder mit Referenzbildern beschrieben werden.

### **III.8 Statistische Auswertung**

Die Signifikanz wurde mittels eines Student's *t*-Test und des Mann-Whitney Test untersucht (p-Werte <0.05 galten als signifikant, p-Werte <0.01 als hoch signifikant). Wo angebracht wurde eine Varianzanalyse verwendet, um die globale Hypothese eines fehlenden Unterschieds zwischen den einzelnen Gruppen (Kontrolle, p35, Bcl-xL) zu untersuchen. Entsprechend der statistischen Auswertung wurden die Fehlerbalken in den Abbildungen gemäß  $\pm$  Standardabweichung eingezeichnet.

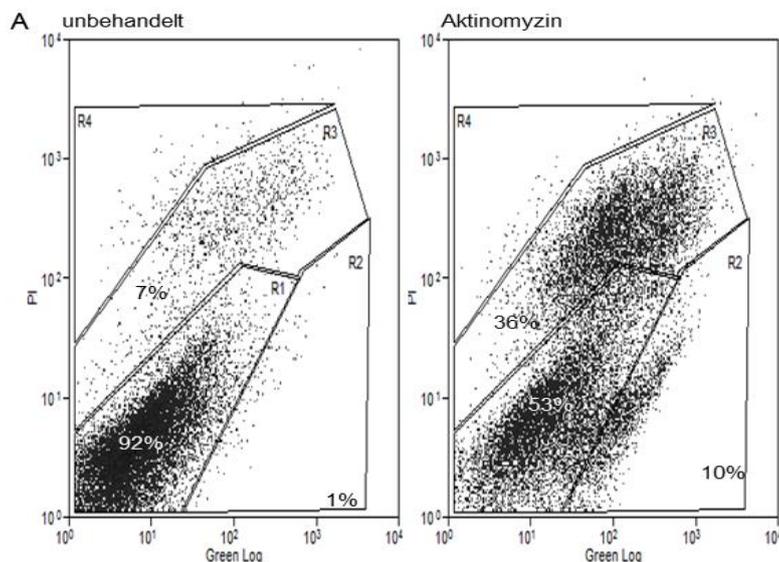
Die statistischen Auswertungen wurde von folgenden Personen begleitet und begutachtet: Dr. Debra Schaumberg, Associate Professor of Epidemiology and Biostatistics, Harvard Medical School und auf persönliche Empfehlung von James H. Ware, Director of the Biostatistics Program for Harvard Catalyst, Mosteller Professor of Biostatistics, Department of Biostatistics, Harvard School of Public Health, mit Hang Lee, Ph.D., Massachusetts General Hospital Biostatistics.

## **IV. Ergebnisse**

Die spezifischen Ziele dieser Arbeit waren die Vergleiche der Wirksamkeit von Bcl-xL und baculoviralen p35 hinsichtlich der Protektion von CEC gegen Zelluntergang und –verlust. In einem ersten Schritt wurde eine mögliche Abhängigkeit der Wirkungsweise der anti-apoptotischen Proteine von einem der beiden apoptotischen Signalwege untersucht (in- versus extrinsisch). Der zweite Schritt galt dann der Untersuchung der protektiven Wirkung beider anti-apoptotischen Proteine zur Verhinderung des Untergangs von CEC während der Kultivierung von Hornhäuten.

### **IV.1 Hervorrufen und Detektion von Apoptose bei primären und immortalisierten kornealen Endothelzellen**

Zur Etablierung des experimentellen Systems wurde Apoptose mit bestimmten, für den jeweiligen apoptotischen Signalweg charakteristischen Apoptose auslösenden Substanzen hervorgerufen (der Topoisomerase II Inhibitor Etoposid für den intrinsischen Signalweg (Shawgo *et al.*, 2008), der anti-neoplastische Wirkstoff, Aktinomyzin D, für den extrinsischen Signalweg (Kaiser and Bodey, 2000). Die Verwendung eines Annexin V / Propidiumjodassays zur durchflusszytometrischen Analyse erlaubte die Unterscheidung der Zellpopulationen in vitale (Annexin V negativ, Propidiumjod negativ), frühapoptotische (Ann+PI-) und spätapoptotische (Ann+PI+, Ann-PI+) CEC (Abbildung 6A). Bei Anstieg der jeweiligen Triggersubstanz nahm der Anteil der frühapoptotischen Population zugunsten jener der spätapoptotischen signifikant ab (Daten nicht gezeigt).



**Abb 6.** Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose humaner kornealer Endothelzellen (*siehe auch Publikation 2, Human Gene Therapy*).

**A.** Durchflusszytometrie zur quantitativen Detektion der Apoptose in CEC mittels AnnV-FITC und PI zur Unterscheidung vitaler, früh- und spätapoptotischer Zellpopulationen. Eine humane CEC Linie wurde für 24 Stunden mit 3 ng/ml Aktinomyzin D inkubiert und mit unbehandelten CEC verglichen (linkes Panel). Vitale Zellpopulationen (AnnV- / PI-, R1) verringerten sich während früh- (AnnV+ / PI-, R2) und spät- (AnnV+ / PI+, R3) apoptotische Zellpopulationen zunahmen (rechtes Panel).

Um die Auswirkungen beider Apoptose auslösender Substanzen auf frühe oder späte Apoptose bei immortalisierten CEC zu untersuchen, wurden die prozentualen Anteile beider Apoptosestadien nach Zugabe einer definierten Konzentration in Abhängigkeit der Einwirkdauer auf die Zellen erhoben (5 µg/ml inkubiert für 0h, 2h, 4h, 6h, 12h, 18h, 21h, 24h, 30h, 36h, 48h; siehe Abbildung 6B). Ähnliche Daten ergaben Experimente mit ansteigenden Substanzkonzentrationen (1, 5, 10µg/ml Etoposid oder Aktinomyzin, Daten nicht gezeigt). Interessanterweise gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl apoptotischer CEC in Abhängigkeit der Signalwege. Frühe Apoptose immortalisierter CEC zeigte keinen kontinuierlichen Anstieg bei kontinuierlich ansteigender Inkubationszeit der Apoptose auslösenden Substanzen, sondern vielmehr verschiedene impulsartige Apoptosespitzen in einer wellenähnlichen Form (z.B. nach 6h, 21h oder 30h Inkubationszeit, siehe Abbildung 6B).

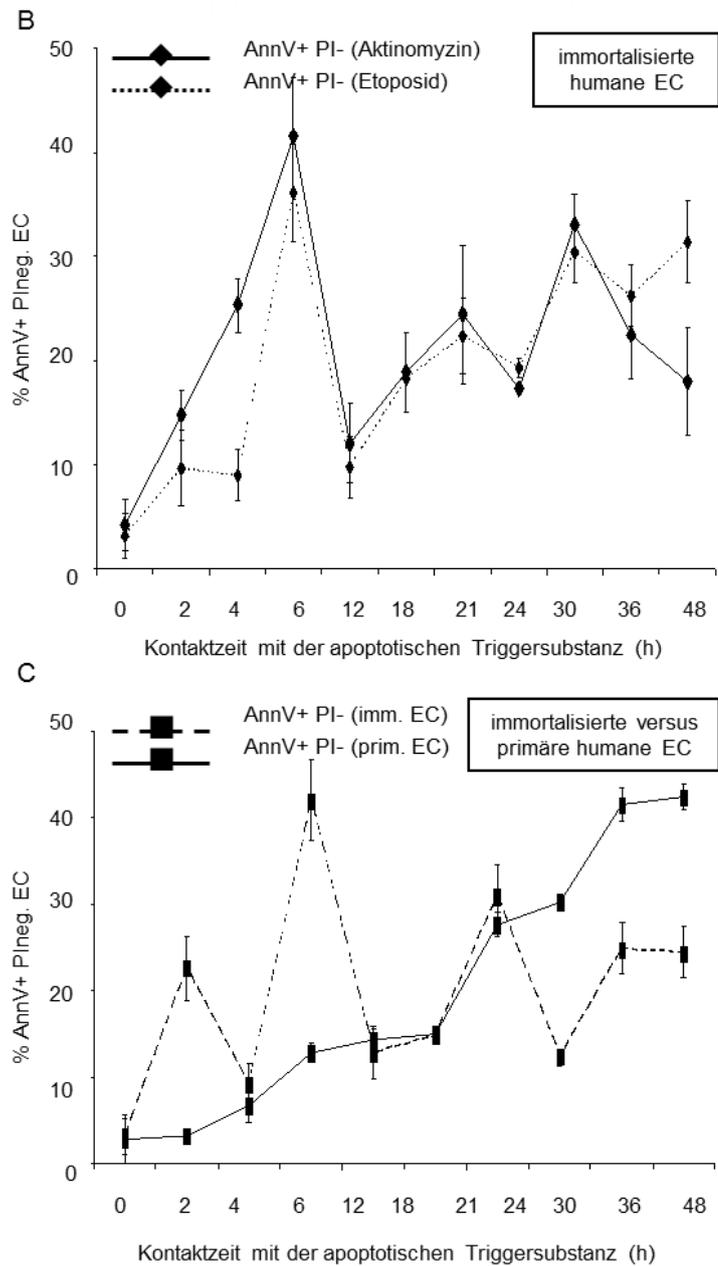
Ein substantieller Unterschied zwischen *primären* und *immortalisierten* CEC konnte hinsichtlich der frühen Apoptose nach Durchführen derselben experimentellen Prozeduren festgestellt werden. Primäre CEC zeigten bei kontinuierlich ansteigender Inkubationszeit der Apoptose auslösenden Substanzen kontinuierlich und nicht wellenförmig zunehmende Populationen frühapoptotischer Zellen (über 40% AnnV+PI- CEC 48h nach Triggern von Apoptose; Abbildung 6C); ähnliche Daten konnten bei Experimenten mit unterschiedlichen Konzentrationen von Etoposid oder Aktinomyzin D ermittelt werden (Daten nicht gezeigt). Bei immortalisierten CEC konnten unabhängig vom Signalweg jeweils ähnliche Anteile früh- oder spätapoptotischer Populationen ermittelt werden.

**Abbildung 6.**

Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose humaner kornealer Endothelzellen (siehe auch Publikation 2, Human Gene Therapy).

**B.** Frühapoptotische Populationen immortalisierter CEC wurden nach Triggern von Apoptose über einen der beiden Signalwege untersucht. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der prozentualen, apoptotischen Zellpopulationen (Etoposid oder Aktinomyzin, 5 µg/ml, bis zu 48 Stunden).

**C.** Allerdings fielen deutliche Unterschiede der apoptotischen Kinetik bei der Durchführung desselben Experiments mit primären Endothelzellen auf (Etoposid 5 µg/ml), insbesondere bei den frühapoptotischen Zellpopulationen (Ann+ / PI-). Die Linien in B und C stellen die Prozentsätze apoptotischer CEC dar (Mittelwert±Standardabweichung).



**IV.2 Hervorrufen und Detektion von Apoptose bei Endothelzellen von Hornhäuten**

Zur Charakterisierung der Wirkungen Apoptose auslösender Substanzen auf primäre CEC wurden nun Primärzellen im Gewebe der Hornhaut untersucht. Sowohl Aktinomyzin D als auch Etoposid wurden verwendet, um Apoptose in der Endothelzellschicht von Hornhäuten hervorzurufen (Abbildung 2). Annexin V-Positivität wurde mittels Konfokalmikroskop detektiert (Abbildung 2A). Die

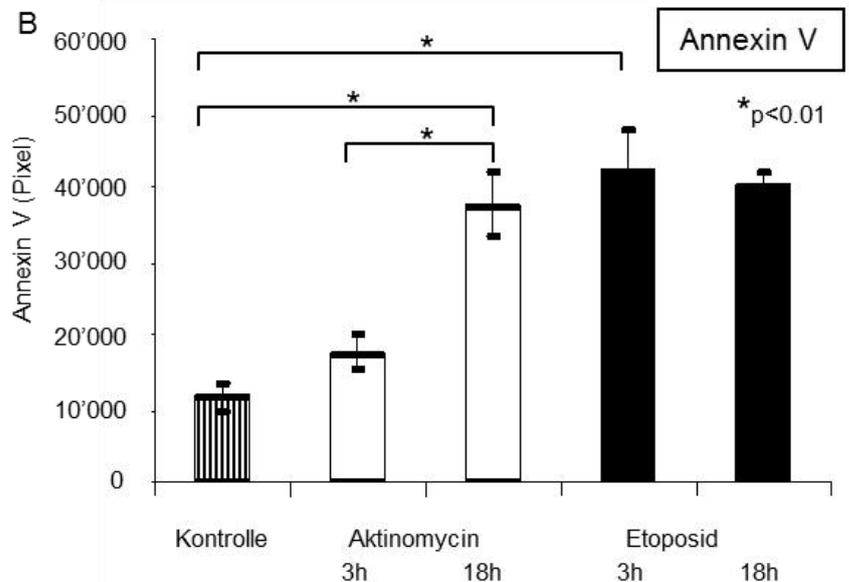
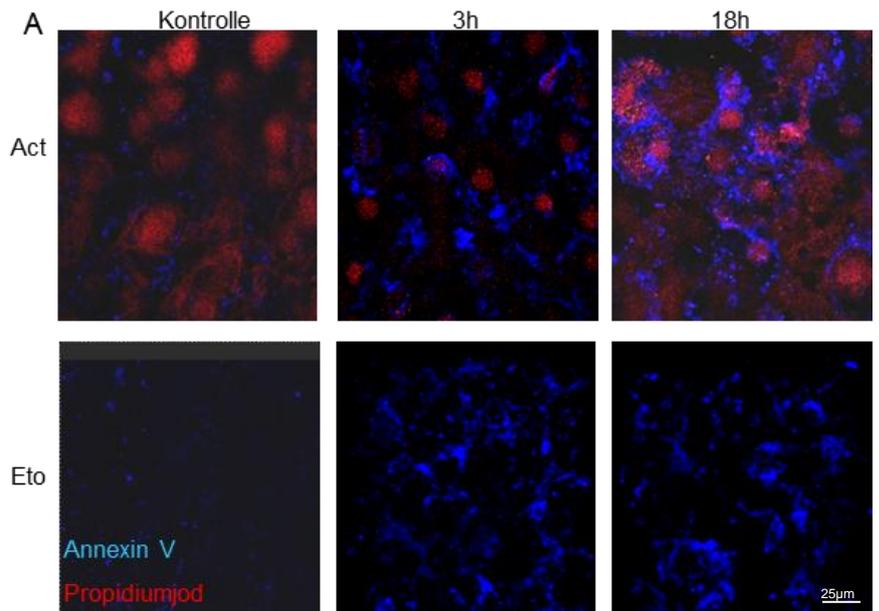
Pixelquantifizierung zeigte einen signifikanten, mindestens zweifachen Anstieg des Annexin V mit steigender Inkubationsdauer mit der Triggersubstanz (Anstieg der Inkubationszeit von 3 h auf 18h; Abbildung 2B). Die Daten zeigen einen signifikant stärkeren Effekt des Etoposid auf die CEC nach einer nur kurzen Inkubationszeit im Vergleich zu Aktinomyzin. Diese Daten bestätigten die vormals in Zellsuspensionen gemessenen Annexin V-positiven Zellpopulationen (Abbildung 7).

**Abbildung 7.** Ansteigende Annexin V-Positivität von CEC in Hornhäuten nach Behandlung mit Apoptose auslösenden Substanzen. (siehe auch Publikation 2, *Human Gene Therapy*).

Immunocytochemische Detektion von Apoptose von CEC in Hornhäuten mittels Annexin V (AnnV) und Propidiumjod (PI).

**A.** Apoptotische Veränderungen der CEC-Membran konnten durch Detektion von Annexin V mittels Konfokalmikroskop nachgewiesen werden, nach Hervorrufen von Apoptose durch Aktinomyzin D und Etoposid (jeweils 10µg/ml, für 3 oder 18 Stunden)

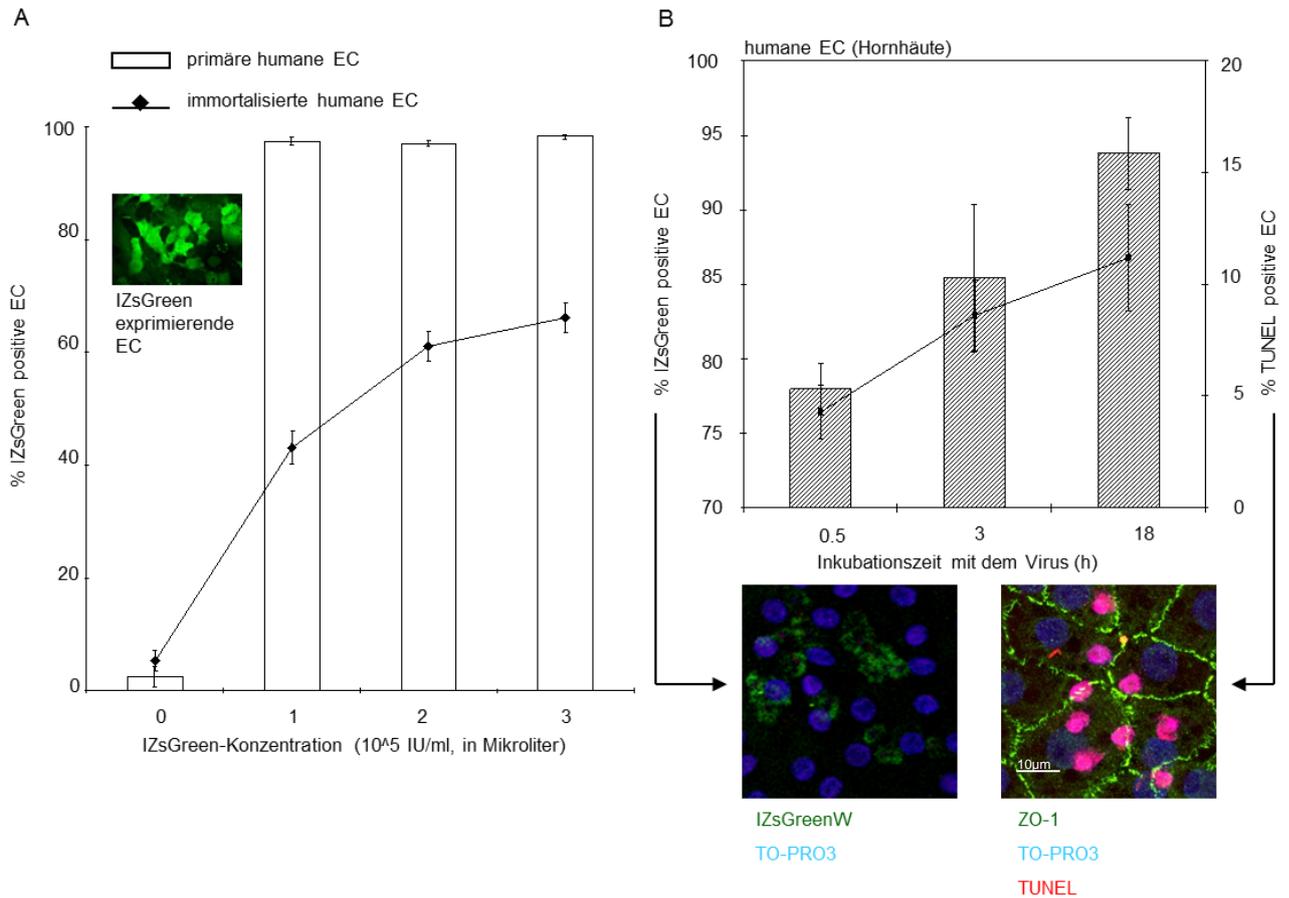
**B.** Die Pixelquantifizierung der Annexin V Aufnahmen zeigt, dass die induzierten apoptotischen Veränderungen signifikant sind (Mittelwert±Standardabweichung)



### **IV.3 Die Kinetik der IZsGreenW-Expression in primären und immortalisierten kornealen Endothelzellen, in Suspensionen und bei Hornhäuten**

Nach dem Nachweis von Apoptose über den in- als auch extrinsischen apoptotischen Signalweg begann die Optimierung der Transduktion von CEC mit viralen Vektoren (zunächst zur Einschleusung des Gens für das grün fluoreszierenden Protein IZsGreenW). Anschließend folgten funktionelle Experimente. Zur Identifikation der besten Viruskonzentration zur CEC-Transfektion wurde zunächst die IZsGreen-Expression in CEC Suspensionen mittels Durchflusszytometrie ermittelt (immortalisierte versus primäre CEC; 0x, 1x, 2x, 3x  $10^5$  IU/ml für 24 Stunden, quantifiziert 24h nach Transduktionsende): Beide Zelltypen zeigten mit steigenden Titern eine ansteigende IZsGreenW-Expression (1,5-6fach). Allerdings zeigten Primärzellen durchweg eine bis zu 2,5fach höhere Reporterexpression als immortalisierte CEC bei vergleichbaren Titern (siehe Abbildung 8A).

Da bei Verwendung des Titors  $3 \times 10^5$  IU/ml die höchste IZsGreenW-Expression gemessen werden konnte, wurde dieser Titer auch für künftige Experimente mit Hornhäuten verwendet. Es folgte eine Transfektion der CEC von Hornhäuten mit  $3 \times 10^5$  IU/ml pHAGE-CMV-MCS-IZsGreenW für 0,5, 3 oder 18 Stunden in Biochrome Cornea Medium I mit 8  $\mu$ g/ml Polybren. Die Expression von IZsGreenW in CEC wurde 24 Stunden nach Transfektionsende gemessen und eine Transfektionsrate von 90% nachgewiesen. Die Apoptose, gemessen mit dem TUNEL Assay, stieg mit Anstieg der Inkubationszeit stetig von 5% auf 11% an (Abbildung 8B). Zur Vermeidung hoher Apoptoseraten durch lange Transduktionsdauern wurden für die folgenden Experimente in Hornhäuten eine Dauer von einer Stunde verwendet.



**Abbildung 8.** Kinetik der IZsGreenW Expression in CEC (Zellsuspensionen und Hornhäute). (siehe auch Publikation 1, Gene Therapy und Publikation 3, Klin Monbl Augenheilkd).

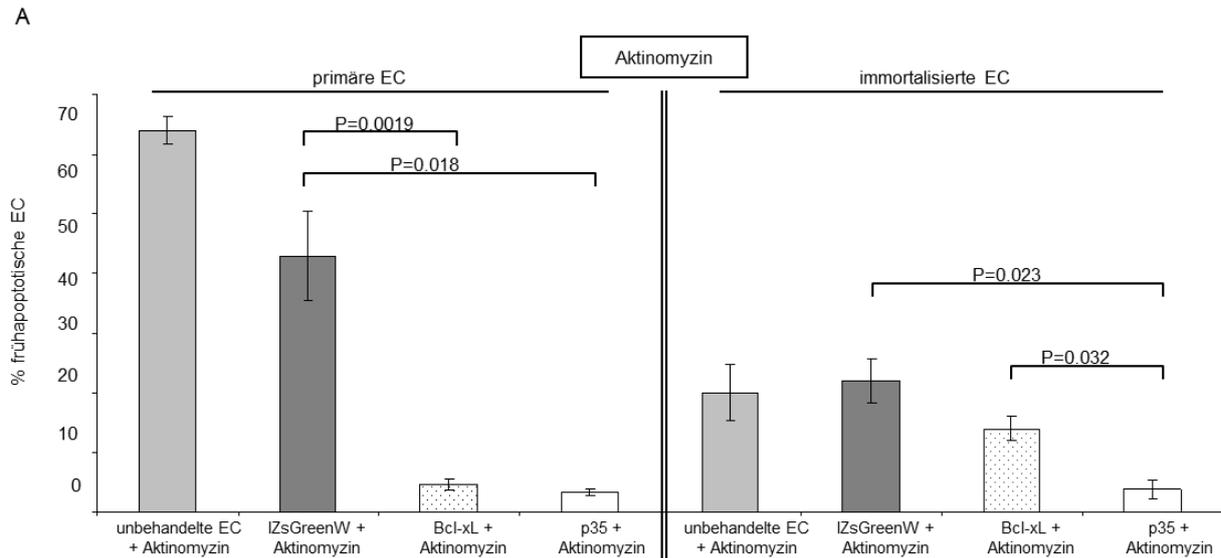
Durchflusszytometrische (A) und immunozytochemische (B) Detektion von IZsGreenW in immortalisierten und primären humanen CEC-Suspensionen oder CEC von Hornhäuten nach der Transduktion mit ansteigenden Konzentrationen von pHAGE-CMV-MCS-IZsGreen ( $3 \times 10^5$  IU/ml, 24 Stunden). Die IZsGreenW-Expression wurde ebenfalls durch Fluoreszenzmikroskopie 24 Stunden nach Transduktion gemessen (A, kleine Abbildung). Die Expression von IZsGreenW und die TUNEL Positivität (Apoptose) von CEC von Hornhäuten wurde mittels eines Konfokalmikroskops 24 Stunden nach der jeweiligen Transduktionszeit untersucht. B. Expression von IZsGreenW nach Transduktion der Hornhäute mit  $3 \times 10^5$  IU/ml pHAGE-CMV-MCS-IZsGreenW in Biochrome Cornea Medium I mit  $8 \mu\text{g/ml}$  Polybren. Die Expression von IZsGreenW wurde mittels Konfokalmikroskop 24 Stunden nach der jeweiligen Transduktionsdauer nachgewiesen. DNA-Fragmentierung wurde entsprechend mit Konfokalmikroskop nach Färbung mit *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling* (TUNEL) Assay detektiert. Die Säulendiagramme beschreiben die Prozentsätze der CEC, welche IZsGreenW überexprimierten (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung). Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils sieben Hornhäute, in sieben Stücke geteilt, untersucht. Die Punkte (verbunden durch die schwarze Linie) stellen die Prozentsätze von TUNEL-positiven CEC dar (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

#### **IV.4 Bcl-xL und p35 schützten korneale Endothelzellen vor Apoptose auslösenden Substanzen, p35 war effektiver als Bcl-xL gegen intrinsische Apoptose**

Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen mit dem grün fluoreszierenden Protein konnten nun Gentransferexperimente mit den anti-apoptotischen Genen erfolgen. Zunächst wurden die Auswirkungen funktionellen Gentransfers bei einer Zelllinie beobachtet (Abbildung 8), danach bei Hornhäuten (siehe Paragraph III.5 und Abbildung 9).

Zur Überprüfung der Hypothese, dass CEC durch anti-apoptotischen Gentransfer vor Apoptose geschützt werden können, wurden primäre und immortalisierte CEC mit den Vektoren pHAGE-CMV-MCS-IZsGreenW, pHAGE-CMV-IZsGreenW-BclxL oder pHAGE-CMV-IZsGreenW-p35 transduziert. In einem zweiten Schritt wurde dann Apoptose mittels des intrinsischen (Etoposid) oder des extrinsischen apoptotischen Signalwegs (Aktinomyzin) hervorgerufen. Um nekrotische CEC auszuschließen, wurden frühapoptotische Populationen (Annexin V+/PI-) mittels Durchflusszytometrie untersucht und mit unbehandelten CEC verglichen.

In der Gruppe der extrinsisch hervorgerufenen Apoptose (Aktinomyzin D) sank die Population frühapoptotischer CEC mindestens um den Faktor 10, sofern diese entweder Bcl-xL oder p35 überexprimierten (jeweils unter 4%, im Vergleich zu 67% [unbehandelte CEC+Apoptosetrigger] und 45% [IZsGreenW+Apoptosetrigger]). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Bcl-xL und der p35-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 9A, linke Abbildung). Allerdings konnte lediglich p35 immortalisierten Zellen vor der starken apoptotischen Triggersubstanz in signifikanter Weise schützen (Abbildung 9A, rechte Abbildung).

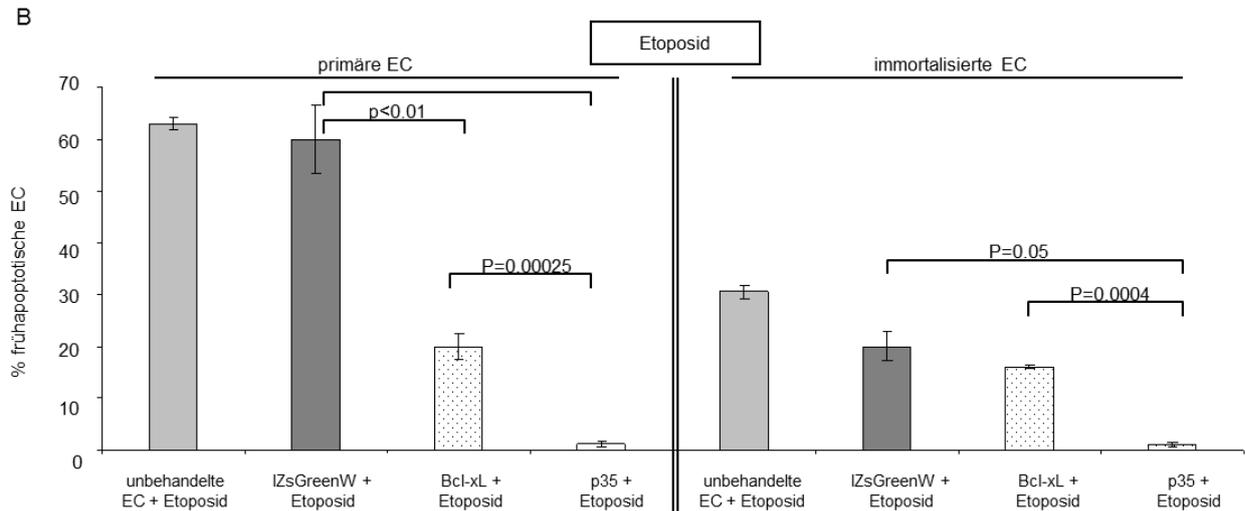


**Abbildung 9.** Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder p35 führte zu signifikant reduzierter Apoptose in primären, aber nicht in immortalisierten CEC (*veröffentlicht in Publikation 2, Human Gene Therapy*).

Quantitative durchflusszytometrische Analyse der AnnV+ / PI- -Populationen primärer und immortalisierter CEC (unbehandelt versus alleinig IZsGreenW oder IZsGr-Bcl-xL oder IZsGr-p35 [ $3 \times 10^5$  IU/ml für 24 Stunden]).

**A.** Nach der Transduktion der CEC wurde Apoptose über den extrinsisch-vermittelten Apoptosesignalweg hervorgerufen (Aktinomyzin, 3ng/ml, 72 Stunden).

Interessanterweise zeigten sowohl p35- als auch Bcl-xL-überexprimierende *primäre* CEC eine signifikante Reduktion der frühapoptotischen Population nach intrinsisch-apoptotischer Triggersubstanz (Etoposid) (3% bzw 19% frühapoptotische CEC, siehe Abbildung 9B) verglichen mit unbehandelten CEC (63%) oder solchen, die allein das grün-fluoreszierendes Protein überexprimieren (59%; siehe Abbildung 9B, linke Abbildung). Weiterhin resultierte die Überexpression von p35 verglichen mit Bcl-xL in einer signifikant reduzierten Apoptose, sowohl in immortalisierten als auch in primären CEC (Abbildung 9B, rechte Abbildung). Dies deutet darauf hin, dass p35 CEC vor intrinsisch-hervorgerufener Apoptose besser schützt als Bcl-xL.



**Abbildung 9.** Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder p35 führte zu signifikant reduzierter Apoptose in primären, aber nicht in immortalisierten CEC (*veröffentlicht in Publikation 2, Human Gene Therapy*).

Quantitative durchflusszytometrische Analyse der AnnV+ / PI- Populationen primärer und immortalisierter CEC (unbehandelt versus alleinig IZsGreenW oder IZsGr-Bcl-xL oder IZsGr-p35 [ $3 \times 10^5$  IU/ml für 24 Stunden]).

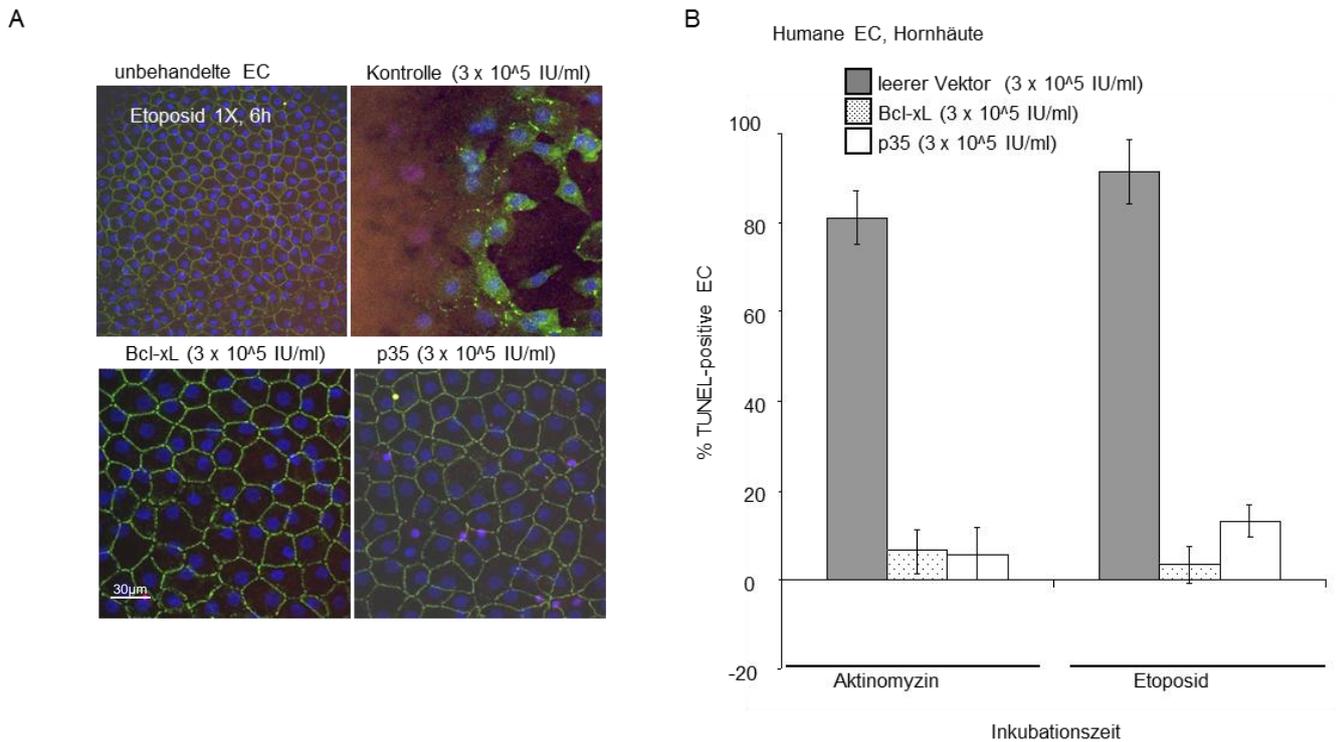
**B.** Nach der Transduktion der CEC wurde Apoptose über den intrinsischen, mitochondrialen Apoptosesignalweg (Etoposid, 3ng/ml, 72 Stunden) hervorgerufen. Primäre CEC, die Bcl-xL oder p35 überexprimierten, zeigten im Gegensatz zu ebenso behandelten immortalisierten CEC signifikant weniger Apoptose. Bei primären CEC war Bcl-xL protektiver gegen extrinsisch hervorgerufene Apoptose. Allerdings war p35 bei intrinsisch, mitochondrial-vermittelter Apoptose effizienter. Die Säulen beschreiben die Prozentsätze der AnnV+ / PI- CEC-Populationen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).

#### IV.5 Die Expression anti-apoptotischer Proteine in kornealen Endothelzellen von Hornhäuten bewahrte die Zellmorphologie und schützte vor starken Apoptose auslösenden Substanzen

Zur Bestätigung der Ergebnisse von Bcl-xL und p35 in primären und immortalisierten CEC wurde nun das korneale Endothel von Hornhäuten mit den Vektoren IZsGreenW, Bcl-xL oder p35 transduziert ( $3 \times 10^5$  IU/ml).

Der immunhistochemische Nachweis von DNA-Brüchen wurde mittels positiven TUNEL-Tests und Konfokalmikroskop nach der Transduktion mit dem jeweiligen Vektor und der Behandlung mit Aktinomyzin D oder Etoposid (3 ng/ml, 6 Stunden) erbracht. Jene CEC, die entweder Bcl-xL oder p35 überexprimierten, zeigten

signifikant weniger Apoptose als CEC, die nur IZsGreen überexprimierten (8-10 fache Verminderung; Abbildung 10); ähnliche Daten wurden nach Behandlung der CEC mit Aktinomyzin D erhoben, mit entsprechenden Ergebnissen in unterschiedlichen experimentellen Designs (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10.** Die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder p35 schützt gleichermaßen CEC von Hornhäuten vor Apoptose, unabhängig des apoptotischen Signalwegs (veröffentlicht in Publikation 1, *Gene Therapy*; siehe auch Publikation 3, *Klin Monbl Augenheilkd*).

Immunocytochemischer Nachweis von Apoptose in CEC von Hornhäuten mittels TUNEL Assay (TO-PRO3 (blau), Nuklei; TUNEL, rot; ZO-1, grün).

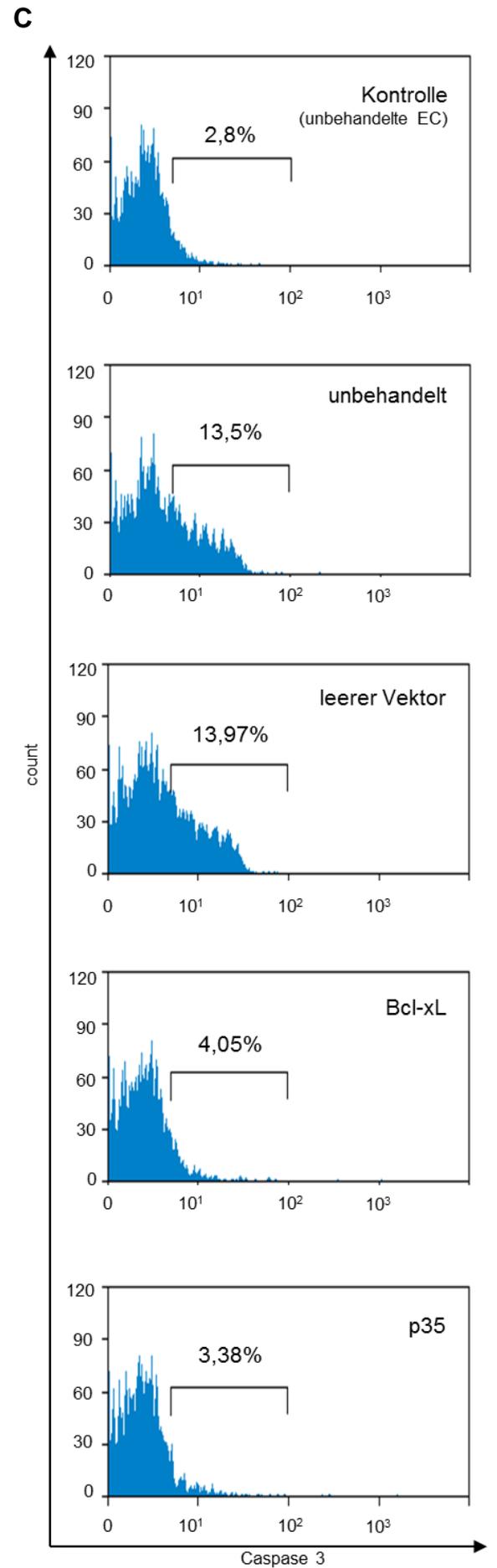
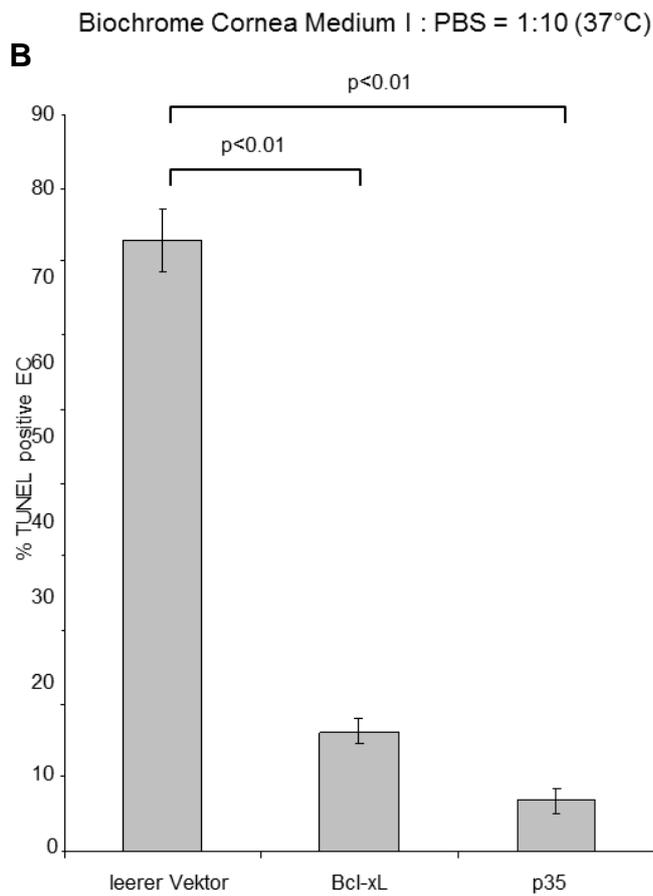
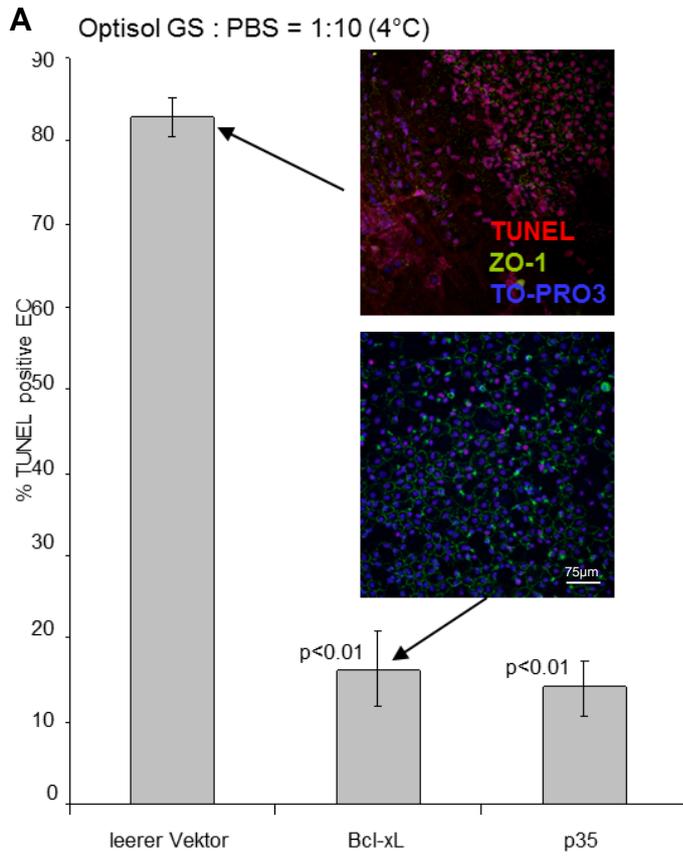
**A.** CEC, die anti-apoptotische Proteine überexprimierten, zeigten signifikant weniger TUNEL-Positivität als unbehandelte CEC nach Behandlung mit Aktinomyzin D oder mit Etoposid (3ng/ml, Inkubation jeweils für 6 Stunden; Etoposid-behandelte Zellen werden dargestellt). Das Bild *oben links* zeigt unbehandelte Zellen (gesunde Kontrollen), *oben rechts* unbehandelte CEC nach Behandlung mit einer apoptotischen Triggersubstanz; unten links CEC transduziert mit Bcl-xL und inkubiert mit einer apoptotischen Triggersubstanz, unten rechts CEC transduziert mit p35 und behandelt mit einer apoptotischen Triggersubstanz).

**B.** Die Säulen entsprechen den Prozentsätzen TUNEL-positiver CEC (Mittelwert±Standardabweichung).

#### **IV.6 Die Expression anti-apoptotischer Proteine führte zu reduzierter Apoptose von CEC während Langzeitkultivierung von Hornhäuten und zu einem Rückgang der Caspase 3**

Nach den Experimenten zur Protektion der CEC vor Apoptose auslösenden Substanzen folgte die Evaluierung von Apoptose während der Kultivierung von Hornhäuten, unter Bedingungen ähnlich einer Hornhautbank. Zur Beurteilung, ob anti-apoptotischer Gentransfer und resultierende Proteinexpression zu einem gesteigerten CEC-Überleben während Hornhautkultivierung führen, wurden Hornhäute während hypothermer Kultivierung (4°C, verbreitet bei Hornhautbanken in Nordamerika, Asien und Australien) und unter Bedingungen der Organkultur (37°C, verbreitet in Hornhautbanken in Europa) untersucht.

Um den Untergang von CEC zu induzieren, wurden Hornhäute in einem mit PBS verdünnten Nährmedium kultiviert. DNA-Brüche wurden mittels TUNEL Assay und Konfokalmikroskop detektiert. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass die Expression von p35 oder von Bcl-xL zu einer signifikanten Reduktion apoptotischen CEC im Vergleich zu den (GFP-exprimierenden) Kontrollen führt (fünffache Reduktion, siehe Abbildung 11a und b). Die Transduktion der CEC mit hohen Bcl-xL-Titern führte zu einem signifikanten Anstieg TUNEL-positiver CEC im Vergleich zu Apoptoseniveaus bei niedrigerem Titer (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse während hypothermer Kultivierung bei 4°C (Abbildung 11a) wurden durch jene unter Bedingungen der Organkultur (37°C) bestätigt (Abbildung 11b). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Überexpression anti-apoptotischer Proteine zu einer dreifachen Verringerung der Caspase 3 in CEC führt (Abbildung 11c). Dabei wurde Caspase 3 in unbehandelten CEC (ohne Zugabe Apoptose auslösende Substanzen) und in CEC gemessen, die Apoptose auslösenden Substanzen ausgesetzt waren (jeweils mit leerem Vektor, Bcl-xL, p35 und ohne Gentransfer).



**Abbildung 11.** Die Expression anti-apoptotischer Proteine durch CEC führte zu verminderter Apoptose während Langzeitkultivierung (*veröffentlicht in Publikation 1, Gene Therapy*).

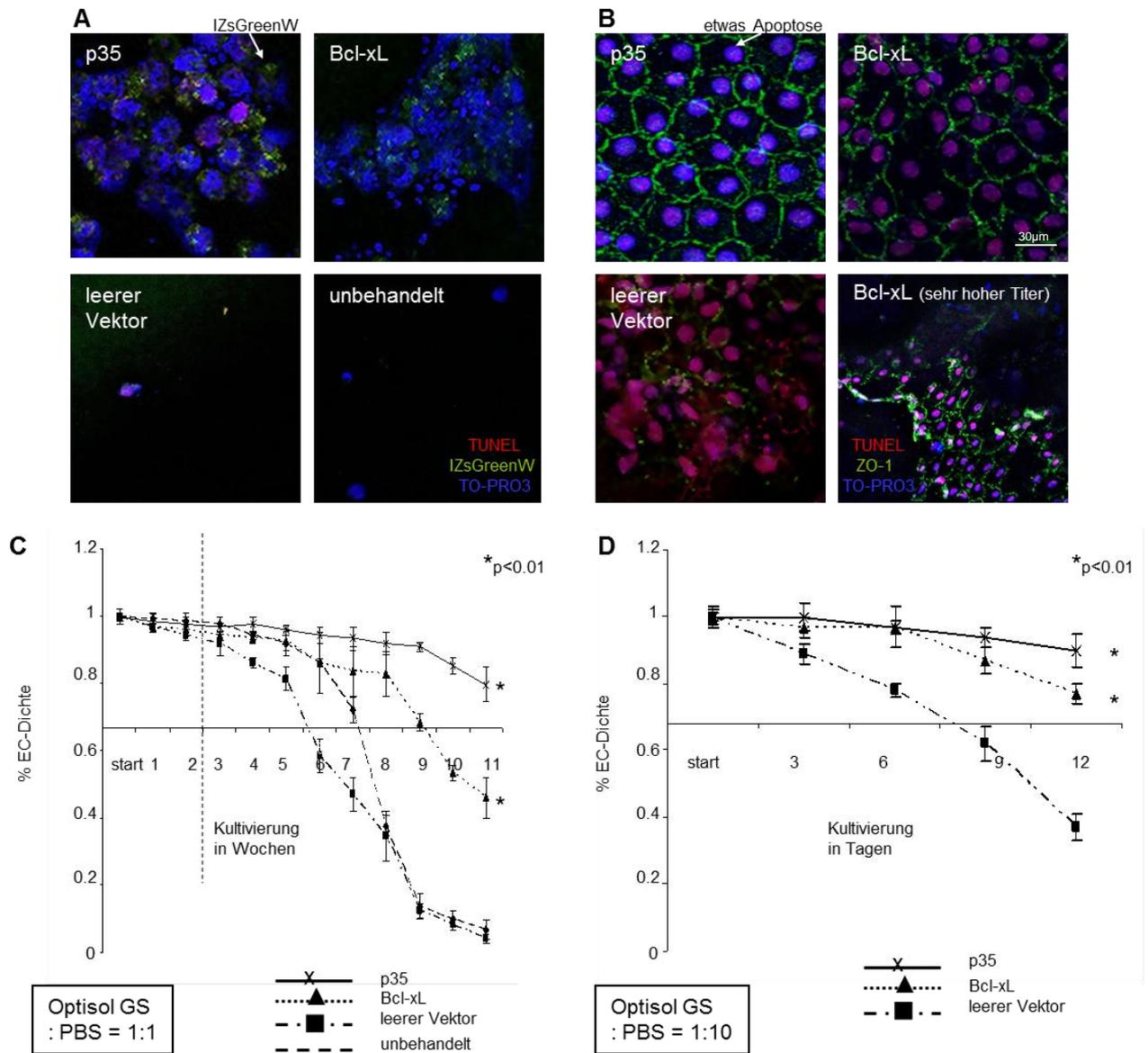
Die Fragmentierung der DNA, einem späten Zeichen von Apoptose, wurde mittels TUNEL Assay (rot) und mittels konfokalem Mikroskop analysiert. Hornhäute wurden über 12 Tage bei 4°C kultiviert (**A**; Optisol-GS®:PBS=1:10) und bei 37°C für 9 Tage (**B**, Biochrome Culture Medium I :PBS=1:10). Zellkerne wurden mittels TO-PRO3 gefärbt, einem Dizyan, welches an die DNA bindet. Die Zellgrenzen wurden durch das *zonula okkludens*-Protein 1 markiert (ZO-1, grün). Die kleinen Bilder zeigen TUNEL Positivität der CEC, die allein das grün-fluoreszierende Protein oder Bcl-xL überexprimieren (sechs analysierte Gesichtsfelder zu jedem Zeitpunkt, drei unterschiedliche Experimente). Die Expression der anti-apoptotischen Proteine führte zu einer Verringerung der Caspase 3 in CEC nach Induktion von Apoptose durch Aktinomyzin D (p35 oder Bcl-xL verglichen mit Kontrollvektor oder mit unbehandelten Zellen (plus Triggersubstanz); "Kontrolle (unbehandelte Zellen)" = CEC ohne apoptotische Triggersubstanz), [Daten nicht gezeigt für CEC mit Vektoren ohne Triggersubstanz] (**C**).

#### **IV.7 Beurteilung der Dichte und der Morphologie kornealer Endothelzellen während Kultivierung unter hypothermen Bedingungen bei 4°C**

Um die Hypothese zu belegen, dass anti-apoptotische Gentherapie CEC vor Zelluntergang schützt, wurde die Dichte der Endothelzellen analysiert, einem Schlüsselparameter für die Beurteilung von Hornhäuten in Hornhautbanken. Zudem wurde die Morphologie der CEC durch Analyse des Prozentsatzes hexagonaler Zellen untersucht.

Die Daten zeigten, dass CEC, welche IZsGreenW-p35 oder IZsGreenW-Bcl-xL überexprimierten, eine signifikant höhere CEC-Dichte bei Langzeitkultivierung in verdünntem Nährmedium bei 4°C aufwiesen als unbehandelte CEC oder jene, die allein IZsGreen W (Kontrollvektor) exprimierten (Abbildung 12). Dieses Ergebnis war angesichts der früheren Daten erwartet worden. Wie in Abbildung 12a gezeigt, konnte die Expression (IZsGreenW) noch immer nach 11 Wochen Kultivierung mittels Konfokalmikroskop nachgewiesen werden. P35-exprimierende CEC zeigten weniger Apoptose und eine intakte Zellmorphologie, verglichen mit Bcl-xL (mehr Apoptose) oder mit dem Kontrollvektor (Lyse der Zellen) (Abbildung 12B). Bei der Untersuchung der Zelldichte konnte festgestellt werden, dass unbehandelte CEC nach sieben Wochen unter den kritischen Wert von 2000 CEC/mm<sup>2</sup> fallen, während dies bei Bcl-xL-exprimierenden erst nach neun Wochen und bei p35-exprimierenden

nach 11 Wochen der Fall war ( $p < 0.01$ , Abbildung 12C). Die Erhebung der CEC-Dichte während Kultivierung in hochverdünntem Nährmedium bestätigte die protektive Wirkung der verwendeten anti-apoptotischen Proteine (Abbildung 12D). Im Vergleich beider anti-apoptotischer Proteine war die Expression von p35 protektiver als Bcl-xL.



**Abbildung 12.** Untersuchung der Dichte und der Morphologie kornealer Endothelzellen während hypothermer Lagerung bei 4°C (veröffentlicht in *Publikation 1, Gene Therapy*). Unbehandelte CEC wurden mit jenen verglichen, die alleinig das grün fluoreszierende Protein ( $3 \times 10^5$  IU/ml), Bcl-xL ( $3 \times 10^5$  IU/ml) oder p35 ( $3 \times 10^5$  IU/ml) überexprimierten. Dichte und Morphologie der derart behandelten CEC wurden nach Kultivierung über 11 Wochen (A: Optisol-GS® : PBS = 1:1) oder über 12 Tage (B: Optisol-GS® : PBS = 1:10) evaluiert. Immunocytochemische Bildgebung in (A) und (B): TO-PRO3 (blau, Zellkerne),

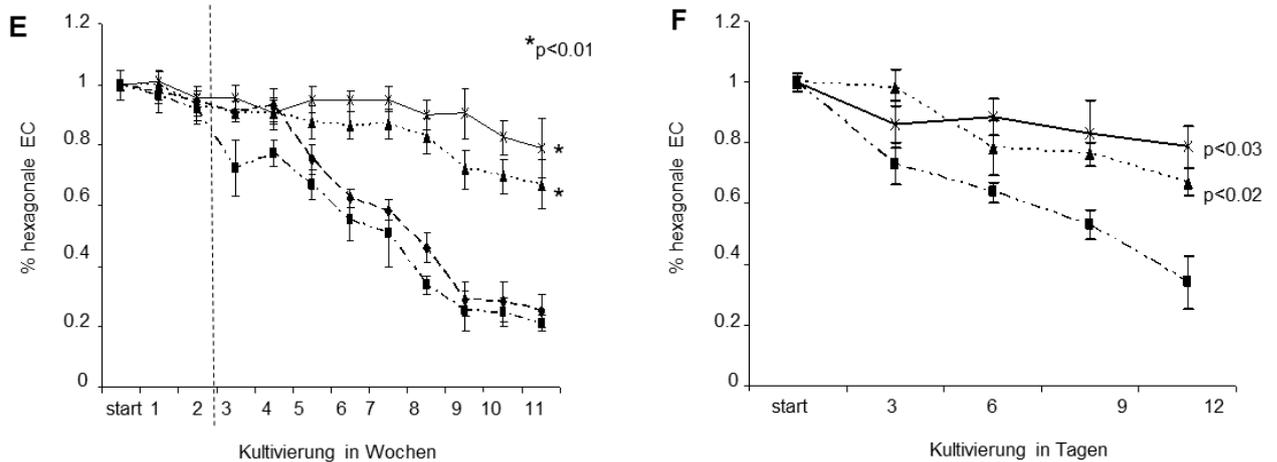
TUNEL (rot, DNA Fragmentierung), IZsGreenW (**A**, grün, ko-exprimiert mit dem interessierenden Gen) oder ZO-1 (**B**, grün, Zonula occludens - Antikörper). Die CEC-Dichte wurde bei Hornhäuten erhoben, welche in verdünntem Optisol-GS<sup>®</sup> kultiviert wurden, wie oben beschrieben. Der Schnittpunkt der x- und y-Achsen in (**C**) und (**D**) entspricht einer Zelldichte von 2000 CEC/mm<sup>2</sup>, der minimalen Zelldichte für die Freigabe von Hornhäuten zur Transplantation durch Hornhautbanken.

#### **IV.8 Transduktion mit hohen Titern führte zu Toxizität für korneale Endothelzellen**

Nach dem Nachweis der protektiven Wirkung anti-apoptotischen Gentransfers sollte untersucht werden, ob die Transduktion der CEC mit lenti-IZsGreenW-Bcl-xL unter Verwendung eines signifikant höheren Titers ( $1.2 \times 10^8$  IU/ml) zu einer noch stärkeren Protektion der CEC führen kann (verglichen mit CEC transduziert mit lenti-IZsGreenW-Bcl-xL des Titers  $3 \times 10^5$  IU/ml). Es zeigte sich, dass die Transduktion mit einem sehr hohen Bcl-xL-Titer zu einem erhöhten Prozentsatz apoptotischer CEC führte. Weiterhin zeigte sich ein niedrigerer Prozentsatz von CEC mit physiologischer Morphologie aufgrund der vektorinduzierten Toxizität (Abbildung 12B, repräsentatives Bild).

#### **IV.9 Korneale Endothelzellen, welche anti-apoptotische Proteine überexprimierten, bewahrten physiologische Zellmorphologie**

Die Morphologie kornealer Endothelzellen ist ein zuverlässiger Indikator für die Zellviabilität. Unter Stress und prä-apoptotischen Zuständen verändert sich die Morphologie der CEC. Typischerweise verlieren derart beeinträchtigte CEC ihre charakteristische, hexagonale Form. Zur Beurteilung der Auswirkungen der angewendeten Gentherapie auf die Morphologie der CEC wurde daher der Anteil der hexagonalen CEC analysiert (Abbildung 12E, F). Die Überexpression sowohl von p35 als auch von Bcl-xL (jeweils  $3 \times 10^5$  IU/ml) bewahrte die physiologische Morphologie, während unbehandelte CEC oder solche, die alleinig das grün fluoreszierende Protein exprimierten, pathologische Morphologien entwickelten. Interessanterweise konnten in der p35 Gruppe stets höhere Prozentzahlen hexagonaler CEC nachgewiesen werden als in der Bcl-xL Gruppe.



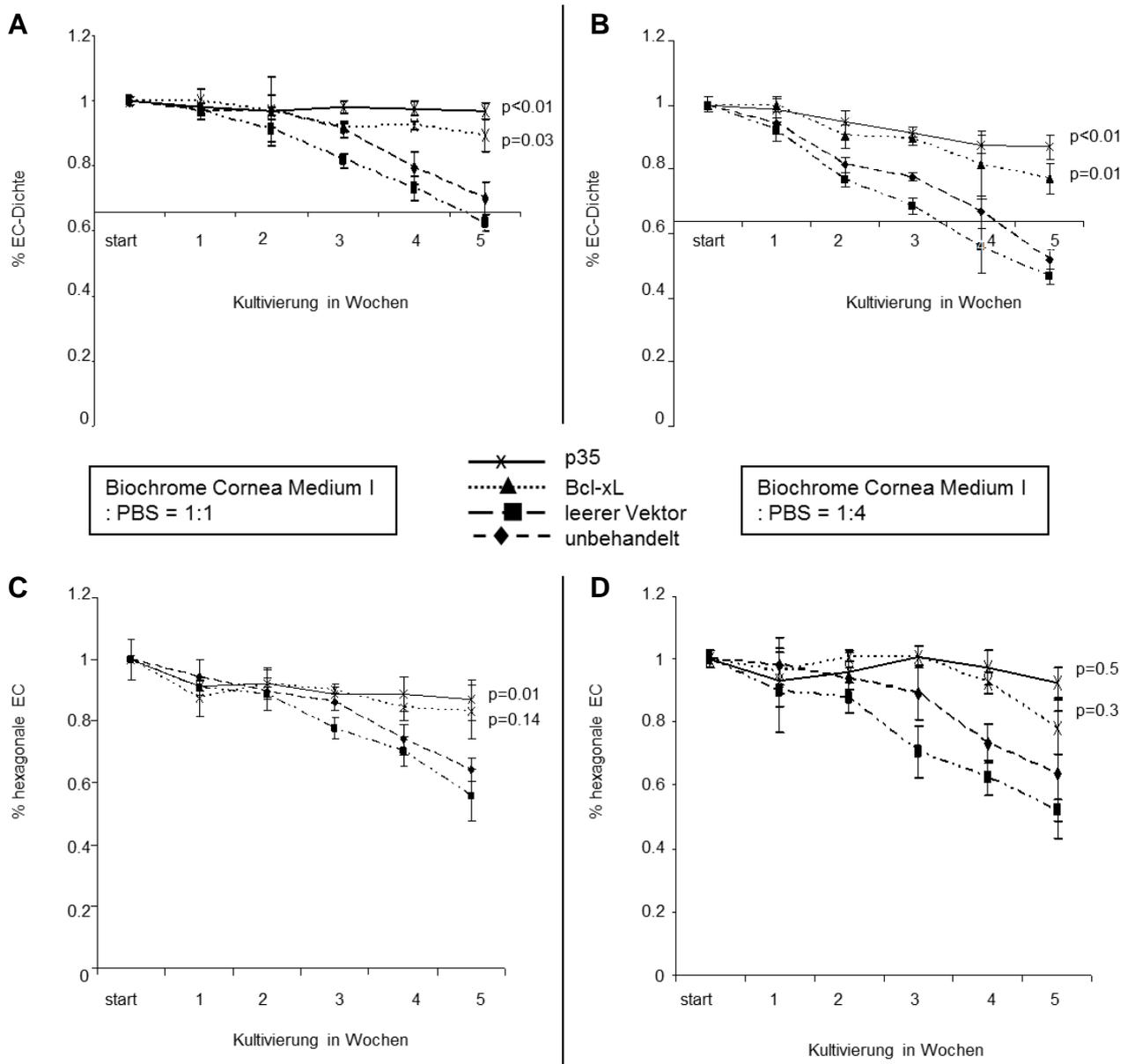
**Abbildung 12.** Untersuchungen der Dichte und der Morphologie kornealer Endothelzellen während hypothermer Lagerung bei 4°C (veröffentlicht in *Publikation 1, Gene Therapy*).

Die Morphologie kornealer Endothelzellen wurde durch das Zählen hexagonaler CEC evaluiert (**E.** Optisol-GS® :PBS =1:1, **F.** Optisol-GS® :PBS =1:10; je höher die Verdünnung, desto rascher der Abfall physiologisch hexagonaler CEC und der CEC-Dichte; sechs analysierte Gesichtsfelder bei jedem Zeitpunkt). Die gepunktete schwarze Linie in **c** und **e** markiert den Zeitraum von 14 Tagen, in dem die Verwendung von Optisol-GS®, dem am weitesten verbreiteten Medium zur hypothermen Hornhautkultivierung, zugelassen ist. Die p-Werte beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle am letzten Messpunkt (\* = p<0.01).

#### IV.10 Die Dichte kornealer Endothelzellen und ihre Morphologie während der Hornhautkultivierung

Die Kultivierung von Hornhäuten unter den Bedingungen der Organkultur ist v.a. in Europa weit verbreitet. Daher wurde der protektive Effekt von p35 und Bcl-xL während der Kultivierung von Spenderhornhäuten bei 37°C untersucht.

Die Ergebnisse waren ähnlich zu jenen, die bei Kultivierung bei 4°C beobachtet wurden. CEC, welche p35 oder Bcl-xL überexprimierten, wiesen signifikant höhere CEC-Dichten [Abbildungen 13a, b; p35: p< 0.01, Bcl-xL: p< 0.05] und höhere Prozentsätze hexagonaler CEC im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen auf [Abbildungen 13C, D; p35: p< 0.005, Bcl-xL: p< 0.05]. Um spenderbedingte CEC-Variationen auszuschließen, wurden diese Experimente jeweils an einer Hornhaut durchgeführt, welche in verschiedene Stücke geteilt wurde.



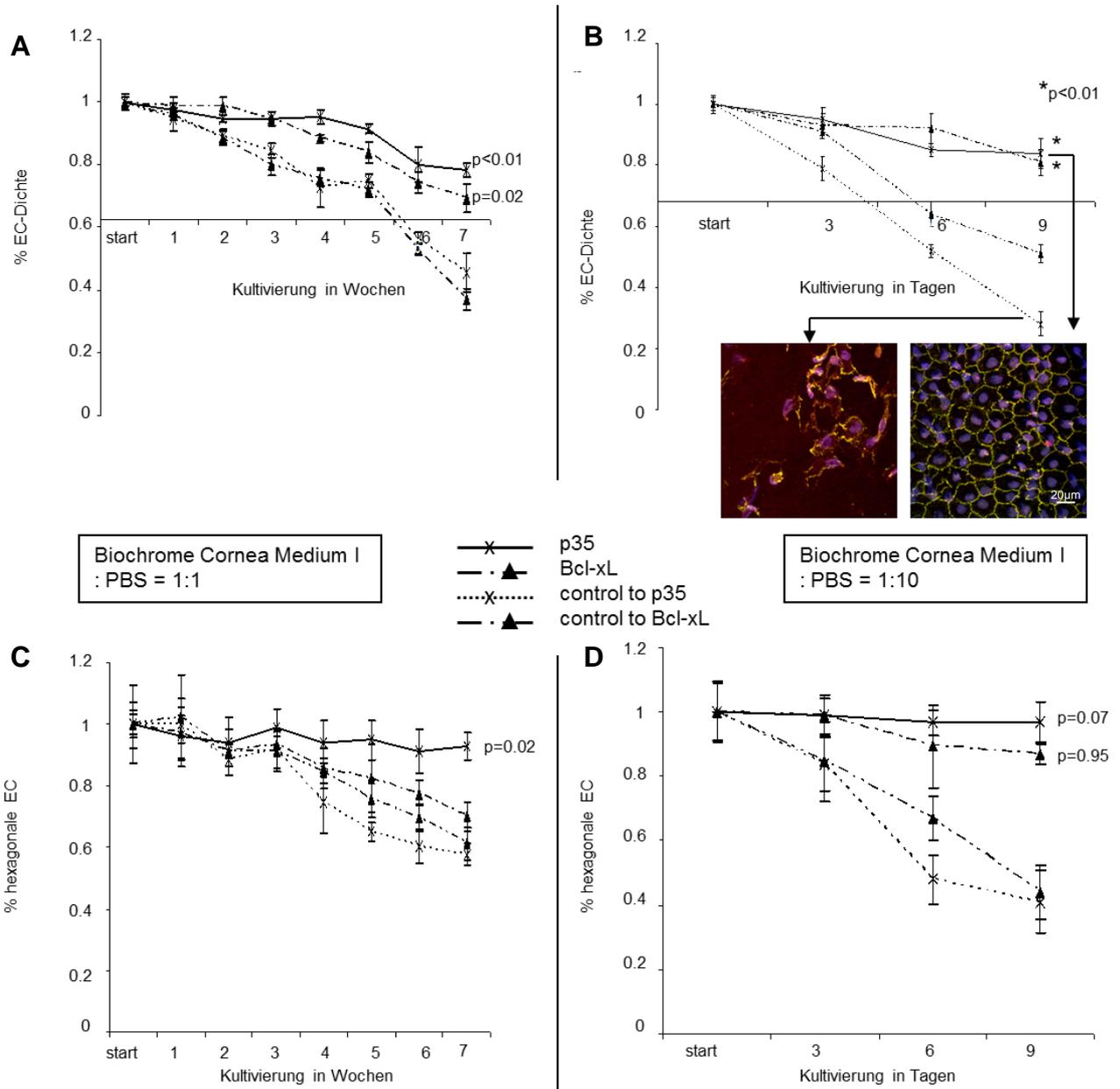
**Abbildung 13.** Messungen der Dichten und der Morphologien kornealer Endothelzellen während Organkultivierung von Hornhäuten (*veröffentlicht in Publikation 1, Gene Therapy*). Unbehandelte CEC wurden mit jenen, die grün fluoreszierendes Protein, Bcl-xL oder p35 überexprimierten, verglichen. Die Verdünnung des Kulturmediums wurde eingesetzt, um Zelluntergang zu provozieren. Die CEC-Dichten wurden daher bei in verdünnten Kulturmedien kultivierten Hornhäuten gemessen (**A**. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:1, **B**. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:4). Der Schnittpunkt der x- und y-Achsen in (**A**) und (**B**) entspricht einer CEC-Dichte von  $2000 \text{ EC/mm}^2$ , der minimal erforderlichen CEC-Dichte zur Freigabe eines Spendertransplantats zur Transplantation durch eine Hornhautbank. Die CEC-Morphologie wurde durch Messung der Anzahl hexagonaler CEC untersucht (**C**. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:1, **D**. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:4; sechs

analysierte Gesichtsfelder bei jedem Zeitpunkt). Die p-Werte beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle am letzten Messpunkt.

#### **IV.11 Die Expression anti-apoptotischer Proteine verlängerte das Überleben kornealer Endothelzellen bei Hornhautspenderpaaren**

Zur Überprüfung der Hypothese, dass Überleben von CEC durch anti-apoptotischen Gentransfer unter Bedingungen ähnlich einer Hornhautbank verbessert werden kann, wurden die experimentellen Bedingungen modifiziert und nun beide Hornhäute desselben Spenders (eine behandelt, die andere unbehandelt) verglichen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde, zum Ausschluß spenderabhängiger Variationen, jeweils eine Hornhaut verwendet, die in verschiedene Stücke geteilt wurde.

Zur Prüfung der Hypothese wurden *standard operating procedures*, gemäß einer nach ISO 9001/2000-zertifizierten Hornhautbank modifiziert (ISO = International Organization of Standardization) (Pels et al., 2008). Intakte Hornhäute wurden in Hornhauthalter nach Boehnke eingespannt und in einem definierten Volumen des Kulturmediums in den vorgegebenen Kulturflaschen gemäß der Richtlinien der *European Eye Bank Association* kultiviert (Pels et al., 2009). Die Transduktion mit lenti-IZsGreenW wurde bei einer Hornhaut des Spenderpaares durchgeführt, während die andere mit dem *Gen des Interesses* transduziert wurde. Die Expression beider anti-apoptotischer Moleküle p35 und Bcl-xL führte zu einem signifikanten Anstieg der CEC-Dichte während Kurzzeit- (9 Tage, Verdünnung 1:10) und während Langzeitkultivierung (7 Wochen, Verdünnung 1:1) ( $p < 0.01$ , bis zu 2.5facher Anstieg; Abbildungen 14A, B). Die Beurteilung der Zellmorphologie allerdings zeigte, dass Bcl-xL-überexprimierende CEC nahezu ähnlich schnell eine pathologische Zellmorphologie entwickelten wie jene, die allein das grün fluoreszierende Protein während Kultivierung über sieben Wochen überexprimierten (Abbildung 14C). Im Gegensatz dazu führte die Überexpression von p35 zur Wahrung der physiologischen CEC-Morphologie, sowohl während Kurz- und Langzeitkultivierung ( $p < 0.01$ , Abbildung 14C, D).

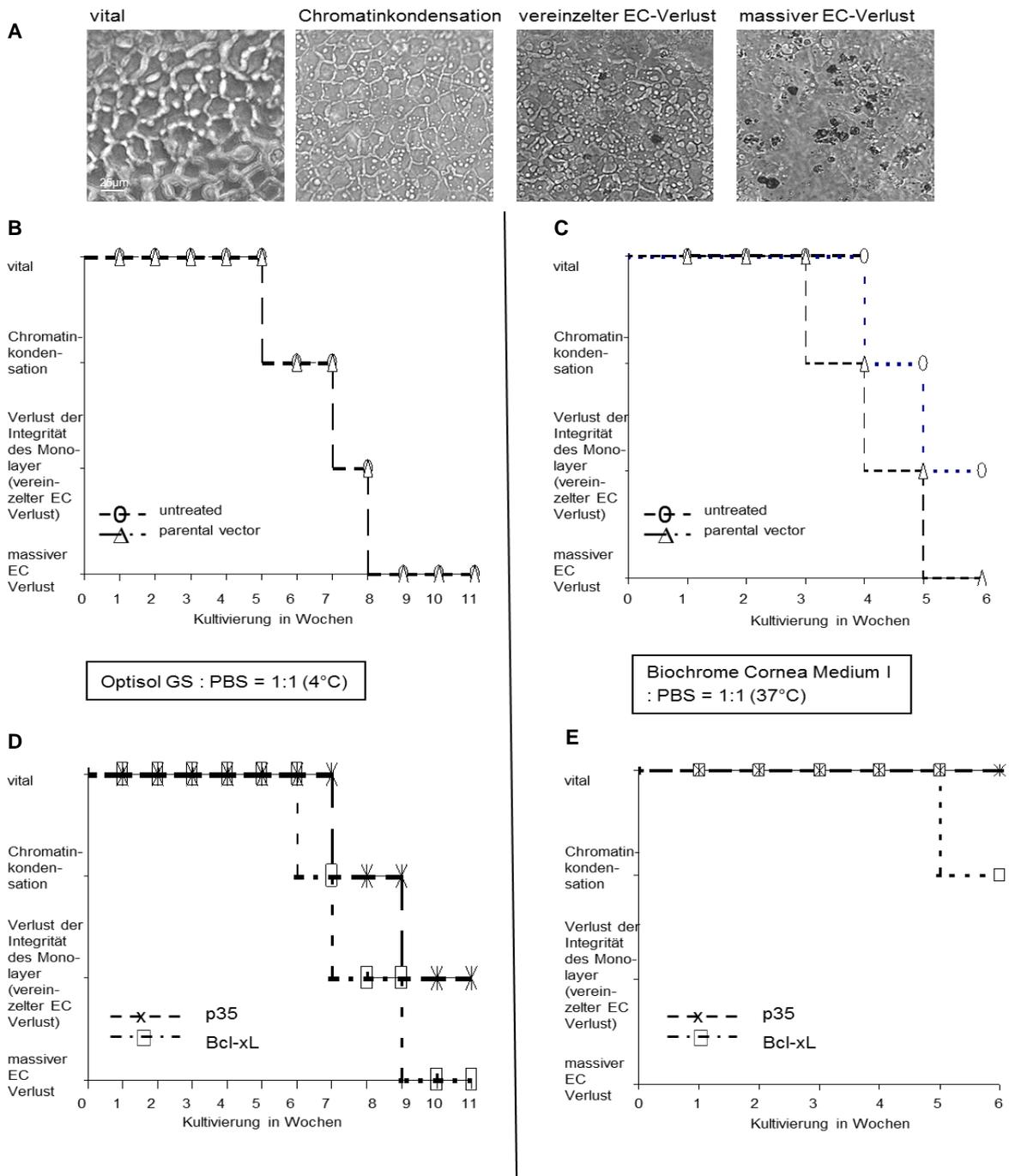


**Abbildung 14.** Die Überexpression anti-apoptotischer Proteine führte zu verlängertem CEC-Überleben beim Vergleich von Spenderhornhautpaaren kultiviert unter Bedingungen ähnlich einer Hornhautbank (veröffentlicht in Publikation 1, Gene Therapy).

Spenderhornhautpaare wurden unter den Bedingungen der Organkultur in *Biochrome Culture Medium I* (1:1 oder 1:10 Verdünnung mit PBS) kultiviert. Eine Hornhaut des Paares wurde mit lenti-IZsGreenW transduziert, die andere Hornhaut des Paares mit lenti-IZsGreenW-Bcl-xL oder mit lenti-IZsGreenW-p35. Die Dichten der CEC wurden in (A) und (B) dargestellt. Der Schnittpunkt der x- mit der y-Achse in (A) und (B) entspricht  $2000 \text{ EC/mm}^2$ , der Mindestzelldichte zur Freigabe eines Transplantates durch die Hornhautbank für eine Transplantation. Repräsentative Bilder der CEC-Schicht, die IZsGreenW oder p35 überexprimierten, sind in den Abbildungen jeweils als *inserts* eingefügt (TUNEL, TO-PRO3, ZO-1 (grün) Färbung). Die Morphologie kornealer Endothelzellen wurde durch Messung der Dichte hexagonaler CEC evaluiert (C. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:1, D. Biochrome Culture Medium I:PBS=1:10; acht analysierte Gesichtsfelder an jedem Messpunkt). Die p-Werte beziehen sich auf die unbehandelte Kontrolle am letzten Messpunkt (\* =  $p < 0.01$ ).

#### **IV.12 Bestimmung des Viabilität kornealer Endothelzellen in Hornhäuten während Langzeitkultivierung**

Zuletzt wurde untersucht, ob die Kultivierung bei 4°C oder jene bei 37°C für entsprechend gentherapeutisch behandelte CEC günstiger ist. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde untersucht, wie lange es dauerte, bis CEC untergingen (durch Klassifikation definierter, lichtmikroskopischer Phasen des Zelluntergangs: vitale CEC, CEC in Chromatinkondensation, Verlust einzelner CEC oder massivem CEC-Verlust) während Langzeitkultivierung unter hypothermer Bedingungen oder in der Organkultur (Abbildung 15a). Unbehandelte CEC und solche, die allein grün fluoreszierendes Protein überexprimierten (Abbildungen 15b [4°C], c [37°C]) wurden mit CEC verglichen, die p35 oder Bcl-xL überexprimierten (Abbildungen 15d [4°C], e [37°C]). Unbehandelte CEC und solche, die allein ein GFP überexprimierten, zeigten massiven Zellverlust nach acht Wochen Kultivierung bei 4°C (Abbildung 15b). Allerdings zeigten CEC, die p35 überexprimierten, Chromatinkondensation nach acht Wochen und Verlust einzelner CEC nach elf Wochen (Abbildung 15d). Ähnlich zeigten unbehandelte CEC bei 37°C nach fünf Wochen massiven Zelluntergang (Abbildung 15c). Die CEC allerdings, die p35 überexprimierten, bewahrten vitalen Charakter ohne Zeichen einer Chromatinkondensation (Abbildung 15e).



**Abbildung 15.** Zellviabilität während Langzeitkultivierung (veröffentlicht in Publikation 1, Gene Therapy).

Definierte Phasen des CEC-Untergangs (vital, Chromatinkondensation, Verlust einzelner CEC, massiver CEC-Verlust) wurden mittels Phasenkontrastmikroskop anhand Referenzbilder (A) bei Hornhäuten untersucht, die bei 4°C (B, D) und bei 37°C (C, E) kultiviert wurden. Die Kontrollen (unbehandelte Zellen und CEC, welche IZsGreenW überexprimieren, B, C) wurden mit jenen, die Bcl-xL oder p35 überexprimierten (D, E), verglichen. CEC, die p35 oder Bcl-xL überexprimierten, zeigten entsprechende Phasen des Zelluntergangs jeweils zu späteren Zeitpunkten als unbehandelte CEC oder jene, die ein GFP überexprimierten.

## **V. Diskussion**

Apoptose kornealer Endothelzellen wurde als wesentlicher Mechanismus für CEC-Verlust während der Hornhautkultivierung identifiziert. Dies führt zum Verlust einer beträchtlichen Anzahl von Hornhäuten, die andernfalls für eine Transplantation zur Verfügung stünden. Sie ist auch eine Hauptursache für Endothelzellverlust nach intraokularer Chirurgie und für Transplantatversagen nach Hornhauttransplantation (Komuro et al., 1999; Albon et al., 2000; Bourges et al., 2004; Gong et al., 2007). Angesichts des minimal-proliferativen Charakters des Endothelzellen und ihrer kritischen Funktion in der Aufrechterhaltung der Hornhauttransparenz, ist eine minimale Dichte an CEC notwendig, um die Transparenz der Hornhaut zu erhalten und damit die Sehkraft zu bewahren.

In der vorgelegten Arbeit wurden die Rolle und die Funktion der anti-apoptotischen Gene Bcl-xL und des baculoviralen p35 hinsichtlich des Schutzes von CEC gegen durch Triggersubstanzen hervorgerufene Apoptose als auch gegen Zellverlust während Hornhautkultivierung untersucht. Systematisch wurde Apoptose an einer humanen CEC-Linie, an primären CEC sowie an Hornhäuten analysiert und dabei signifikante Unterschiede identifiziert. Diese Ergebnisse zeigten, dass anti-apoptotische Gentherapie von CEC durchweg zu einer Verminderung der Apoptose bei primären CEC-Suspensionen oder bei Hornhäuten unter Wahrung der physiologischen Zellfunktion und der Morphologie führte. Zudem konnte gezeigt werden, dass anti-apoptotische Gentherapie CEC während der Hornhautkultivierung schützte, was darauf hindeuten könnte, dass diese Gentherapie an der Hornhaut zu höherwertigem Gewebe führt.

### **V.1 Lentivirale Vektoren für Gentransfer in korneale Endothelzellen**

In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass die Verwendung lentiviraler Vektoren für den Transfer von Genen in CEC zu einer rasch beginnenden Proteinexpression führt (Wang et al., 2000; Barcia et al., 2007; Parker et al., 2007; Bertelmann, 2009). Lentiviral-vermittelte Genexpression resultierte in hoher Expression von IZsGreen bereits 30 Minuten nach Infektion, wobei wenig oder keine Zytotoxizität beobachtet wurde. Die lentiviralen Vektoren waren replikationsinkompetent, um eine schädliche Wirkung durch Replikationen der Viren zu unterbinden. Um einen möglichen,

protektiven Effekt auf die Zellviabilität zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Titer Bcl-xL zur Transduktion von CEC verwendet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der TUNEL-Positivität bei CEC festgestellt, die mit Bcl-XL oder p35 desselben Titers transduziert wurden. Ein Titeranstieg um den Faktor 1000 resultierte jedoch in beschleunigtem Zelluntergang.

## **V.2 Gentransfer in korneale Endothelzellen inhibiert Apoptose**

Protektive Effekte anti-apoptotischen Gentransfers wurden durch andere Gruppen bereits in der Hornhaut der Ratte (Parker et al., 2007), der Maus (Barcia et al., 2007) und in kornealen Endothelzelllinien von Maus und Mensch (Beutelspacher et al., 2005; Barcia et al., 2007; Gong et al., 2007) nachgewiesen. Um die Hypothese zu bestätigen, dass anti-apoptotischer Gentransfer das CEC-Überleben fördert, wurden aufgrund ihrer Relevanz in Klinik und Transplantation hier *humane* CEC untersucht. Die in primären CEC gewonnenen Ergebnissen unterschieden sich deutlich von jenen Ergebnissen, die in der humanen CEC-Linie, dem *preferred research model*, erhalten wurden. Die Unterschiede bezogen sich auf verschiedene Bereiche, der Detektion von Apoptose, als auch der Expression sowohl des Reporter- als auch des funktionellen Gens. Mit zunehmender Induktionsdauer zeigten primäre CEC einen kontinuierlichen Anstieg apoptotischer CEC. Entsprechende Experimente in der CEC-Linie zeigten allerdings einen *wellenförmigen* Verlauf mit mehrerer Spitzen apoptotischer Zellen. Zudem waren die Apoptoseraten IZsGreen positiver CEC in der Zelllinie bis zu 2.5fach niedriger als jene primärer CEC, zeigten veränderte Kinetik und verschiedene Charakteristika nach Transduktion mit anti-apoptotischen Proteinen. Die Apoptoserate erreichte insgesamt nicht das Niveau wie in Primärzellen. Dies mag die Folge der SV40-Transfektion der CEC sein, die in diesen Untersuchungen verwendet wurde (Bednarz et al., 2000). Zusammengefasst legen diese Daten nahe, dass das apoptotische Verhalten der CEC-Linie die Charakteristika von Apoptose in CEC *in vivo* nur eingeschränkt widerspiegelte. Die Daten bei Verwendung humaner Hornhäute bestätigten die jene Ergebnisse, die in der Primärzellkultur gewonnen wurden.

In der vorgelegten Arbeit konnte Apoptose kornealer Endothelzellen, die über den ex- oder den intrinsischen Signalweg vermittelt wurde, durch die Überexpression von

p35 oder Bcl-xL signifikant vermindert werden. Es ist bekannt, dass FasL- und TNF-induzierter Zelltod durch Apoptose über den extrinsischen Signalweg vermittelt wird (Laster et al., 1988). Allerdings ist dieses Signalnetzwerk deutlich komplexer als die lineare, rezeptor-getriggerte Caspasekaskade, z.B. bei Berücksichtigung der umfangreichen mitochondrialen Kontrollmechanismen der Apoptose im intrinsischen Signalweg. Bcl-xL hemmt das pro-apoptotische Signal nach der Caspaseaktivierung primär auf mitochondrialem Niveau (Hengartner, 2000), einer Eigenschaft, welche auf die *BH3-only* Unterfamilie des Bcl-2 Proteins beschränkt zu sein scheint (Sattler et al., 1997). P35 wurde als Pan-Caspaseinhibitor charakterisiert (Clem, 2007). Gemäß der gewonnenen Daten entwickeln CEC frühe oder späte Apoptose, unabhängig vom apoptotischen Signalweg. Schutz vor Zelluntergang konnte entweder durch die Überexpression von Bcl-xL oder von baculoviralem p35 erreicht werden. p35 war aufgrund des breiteren anti-apoptotischen Spektrums wirksamer gegen intrinsisch-vermittelte Apoptose verglichen mit Bcl-xL.

### **V.3 Anti-apoptotischer Gentransfer schützt korneale Endothelzellen während der Hornhautkultivierung**

Interessanterweise wurden frühere Untersuchungen an Hornhäuten nicht unter Bedingungen ähnlich jener in einer Hornhautbank durchgeführt. Dies ist jedoch für eine Evaluierung der späteren Anwendbarkeit von großer Bedeutung. Die Ergebnisse der vorgelegten Untersuchungen beschreiben die Wirksamkeit des anti-apoptotischen Gentransfers in CEC unter diesen Bedingungen sowohl hinsichtlich des wirksameren Gens als auch unter Berücksichtigung des Titers.

Die vorgelegten Daten zeigen, dass lentiviral-vermittelte Genexpression zu hoher IZsGreenW Expression bereits 30 Minuten nach Transduktion führt. Untersuchungen bezüglich der Effekte zweier Virustiter auf die Zellüberleben (gemäß Zhang et al., 2004) konnten zeigen, dass die Verwendung eines sehr hohen Titers Bcl-xL nicht protektiven, sondern schädlichen Einfluß auf das Überleben der CEC hatte und dass die Apoptoserate anstieg.

Die Ergebnisse der Kultivierungsexperimente, durchgeführt unter Bedingungen ähnlich in einer Hornhautbank, zeigten höhere Überlebensraten der CEC nach

Gentherapie mit p35 oder Bcl-xL, sowohl hinsichtlich der Bewahrung der Zellvitalität als auch der Zellmorphologie. Die Verlängerung des Überlebens von CEC während der Hornhautkultivierung durch anti-apoptotischen Gentransfer ist eine neuartige Erkenntnis. Dies bestätigte die Hypothese, dass Apoptose von CEC entscheidend für die Gewebequalität von Hornhäuten ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Gentherapie von CEC mit dem Pan-Caspaseinhibitor p35 effektiver als mit Bcl-xL ist, sowohl während Kultivierung unter den Bedingungen der Organkultur (37°C) als auch unter hypothermen Bedingungen (4°C). Die Anwendung dieser Technologie in der Hornhautkultivierung könnte zu einer Steigerung der für Transplantationen verfügbaren Hornhäute führen. Zudem könnte die Rate der Transplantatversager nach erfolgter Hornhautübertragung abnehmen, da der Untergang von CEC eine Hauptursache für Hornhauttransplantatesversagen darstellt, unabhängig von der Ursache.

#### **V.4 Molekulare Mechanismen von Bcl-xL und p35**

Die Ergebnisse zeigten höhere CEC-Dichten und höhere Prozentzahlen von CEC mit physiologischer Morphologie bei Überexpression von p35 und von Bcl-xL. Dieser Unterschied mag durch die jeweilige Wirkung der Proteine auf die zellintrinsic, apoptotischen Signalwege erklärbar sein. Ein wesentliches Charakteristikum der Bcl-2 Proteinfamilie ist, dass Mitglieder Sequenzhomologien mit vier Domänen (BH1, 2, 3, 4) teilen. Die BH3 Domäne ist wichtig für die Durchführung der Todesfunktionen pro-apoptotischer Moleküle (Puthalakath et al., 2002). Interessanterweise inhibieren die anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL oder Bcl-2 lediglich pro-apoptotische Moleküle der *BH3-only* Subfamilie [solche wie Bad, Bid oder Bim] (Sattler et al., 1997). Daher können pro-apoptotische Moleküle, welche über viele Domänen verfügen (wie Bax, Bak oder Bok) noch immer das Todesprogramm initiieren und zu Apoptose führen. Im Gegensatz dazu inhibiert p35 ein breites Spektrum von Caspasen. Die Spaltung der reaktiven Schleife des p35 führt zu einer Translokation des N-Terminus von p35 in das Aktivitätszentrum der Caspasen und bewirkt so die irreversible Hemmung der Caspase (Zhou et al., 1998; Xu et al., 2001). Die vorgelegten Daten lassen vermuten, dass die breite Unterdrückung der Caspasen eine höhere Wirksamkeit bezüglich der Protektion von CEC bewirkt als die selektive Hemmung proapoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie.

## **V.5 Translation dieses Genterapieansatzes in die Klinik**

Die funktionelle Bedeutung anti-apoptotischen Gentransfers von Bcl-xL oder p35 wird durch die Protektion der CEC verdeutlicht, nach der Behandlung mit starken Apoptose auslösenden Substanzen als auch während der Hornhautkultivierung. Diese Ergebnisse sind aufgrund der besonderen Bedeutung der CEC für die Transparenz und das Überleben einer Spenderhornhaut sehr wichtig. Es ist bekannt, dass Verlust von CEC während der Hornhautkultivierung sowohl durch Apoptose als auch durch Nekrose verursacht wird, wobei Apoptose vorherrscht (Komuro et al., 1999). Wie berichtet wurde, müssen bis zu 30% aller Spenderhornhäute aufgrund zu hohen CEC-Verlusts während der Hornhautkultivierung verworfen werden (Means et al., 1995; Jones et al., 2009). Weiterhin gehen zirka 48% der CEC innerhalb des ersten Jahres nach Hornhauttransplantation unter (Ruusuvaara and Setala, 1988), eine Rate, welche im zweiten Jahr über 60% beträgt (Vasara et al., 1999). Die vorgelegten Daten deuten darauf hin, dass anti-apoptotischer Gentransfer die Anzahl der für Transplantationen verwendbarer Spenderhornhäute durch Verbesserung der CEC-Qualität und durch Reduktion der Verwurfraten steigern könnte.

Allerdings ist die Translation dieses Ansatzes in die klinische Praxis regulatorischen Vorgaben unterworfen: Da ein replikationsinkompetenter, lentiviraler Vektor verwendet wurde, wird das Plasmid dauerhaft in die Empfänger-DNA integriert. Zur Vermeidung einer dauerhaften Integration kann ein nicht-integrierender viraler Vektor (wie ein Adenovirus oder ein adeno-assoziiertes viraler Vektor) als Vehikel gewählt werden. Zudem kann der Promoter selbst induzierbar hergestellt werden, z.B. mittels eines Tetracyclin- (an/aus) Schalters. Dies könnte die Sicherheit und die Steuerung während und nach Applikation in humanem Gewebe verbessern. Eine weitere wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, ob und wieviele Partikel des viralen Vektors auf der CEC-Oberfläche nach Abschluß der Transduktion und folgendem Abwaschen des Endothels mit PBS gefunden werden können. Auf der Membran der CEC verbliebene virale Vektoren könnten andere Zellarten in der anatomischen Umgebung des Hornhautendothels transduzieren (z.B. solche mit hohen proliferativen Eigenschaften). Dies könnte zu Sicherheitsbedenken hinsichtlich der Induktion eines Tumorwachstums führen. In den vorgelegten Daten konnte Genexpression ohne erkennbare Minderung bis zu elf Wochen nach Transduktion durch das grün fluoreszierende Protein nachgewiesen werden. Diese Daten

bestätigen die Daten von Barcia et al im Mausmodell [Barcia et al., 2007; Expression nach 8 Wochen nachweisbar].

Dank der sehr geringen proliferativen Potenz von CEC sind bis heute in der Literatur kein CEC Tumoren beschrieben. In den vorgelegten Experimenten bildeten die CEC nicht einmal Bilayer aus, nicht einmal bei *in vitro* Experimenten. Daher ist das Risiko einer Induktion lokaler Tumoren sehr gering. Weiterhin basieren die Experimente der CEC in diesem Zusammenhang konzeptionell auf zwei unterschiedlichen Überlegungen: a) Induktion der Proliferation von CEC, b) Unterdrückung des Zelluntergangs von CEC. Während die Förderung der CEC-Proliferation mit ernsthaften Bedenken bezüglich der Induktion verschiedener Pathologien verbunden ist, ist die Tumorerzeugung durch Unterdrückung der CEC-Apoptose auf konzeptionellem Ebene kaum vorstellbar. Dies wurde durch das *'proof of principle'* Experiment im Mausmodell der Hornhauttransplantation bestätigt, in dem dieselben viralen Vektoren wie in der hier vorgelegten Arbeit verwendet wurden (lenti-IZsGr-Bcl-xL). Diese Daten zeigten, dass Hornhauttransplantate, deren CEC Bcl-XL überexprimierten, ein signifikant höheres Transplantatüberleben aufwiesen als Kontrollen, ohne Anzeichen pathologischer Proliferation von CEC oder von anderen Zelltypen (Nachbeobachtungszeit in diesem Modell war 8 Wochen; Barcia et al., 2007). Allerdings sind längere Nachbeobachtungszeiten in diesem Modell notwendig, um weiterhin die Sicherheit des Ansatzes zu überprüfen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen der Biodistribution der behandelten Zellen als auch der Tumorgenese von CEC und anderer Zelltypen relevant.

In Abstimmung mit der Bundesoberbehörde werden aktuell Studien durchgeführt, welche eine realistische Translation in eine Phase I-Studie vorbereiten. Dabei führt der Weg über alternative Vektoren (wie dem adeno-assoziierten viralen Vektor), aber auch über Inhibitoren pro-apoptotischer Faktoren als *small molecules*. Mittlerweile haben Unternehmen aus Europa und Asien das Marktpotential dieser Anwendung erkannt und arbeiten an Produkten zur Protektion des Hornhautendothels (z.T. bereits in Phase I Studien). Die Marktreife ist frühestens Ende dieser Dekade zu erwarten.

Angesichts der Biologie der CEC als Monolayer ist es denkbar, dass dieser Ansatz auch bei anderen Formen der Zelltransplantation angewendet werden kann. Beispiele könnten kultivierte mesenchymale Stammzellen zur Steigerung des Knochenwachstums sein (Nakamura et al., 2009) oder die Transplantation of *tissue engineered corneal epithelial sheets* (Hayashi et al., 2009). Angesichts des Risikos des unkontrollierten Zellwachstums nach anti-apoptotischem Gentransfer, muss die Anwendung dieses Ansatzes bei Zellen mit hoher Proliferationsneigung mit Vorsicht geprüft werden.

## **VI. Zusammenfassung, Ausblick**

Zusammenfassend unterstützen die vorgelegten Daten die Hypothese, dass anti-apoptotischer Gentransfer in korneale Endothelzellen deren Überlebensrate durch Hemmung des Zelluntergangs während der Kultivierung von Spenderhornhäuten steigert. Diese Gentherapie war sowohl gegen Zelluntergang des intrinsisch- als auch extrinsisch-vermittelten apoptotischen Signalwegs wirksam. Die Ergebnisse demonstrierten die Effektivität, mit welcher diese protektiven Proteine gegenüber starken Apoptose auslösenden Substanzen wirksam waren. Dies legt den Schluss nahe, dass die Translation dieses Ansatzes in die Klinik zu Strategien führen kann, welche das Überleben kornealer Endothelzellen sowohl während der Hornhautkultivierung als auch nach der Transplantation erhöhen könnte. Das Endothelzellüberleben ist von ausserordentlicher Bedeutung für die Verwendbarkeit einer Spenderhornhaut für eine Transplantation als auch für das anschließende Transplantatüberleben. Gegenwärtig werden zirka 30% der Hornhäute bereits aufgrund von Endothelzelluntergang während der Kultivierung verworfen. Die Translation dieses anti-apoptotischen Ansatzes in die Kultivierung von Spenderhornhäuten in Hornhautbanken könnte daher die Anzahl der für die Transplantation verfügbaren Spendergewebe steigern und so die Patientenversorgung verbessern.

Da Transplantate mit höherer Endothelzellendichte weniger wahrscheinlich versagen, folgte hieraus eine höhere Wahrscheinlichkeit für verlängertes Transplantatüberleben und daher eine verringerte Wahrscheinlichkeit einer Re-Transplantation. Interessanterweise ist dieser Ansatz auch auf die jüngsten Entwicklungen im Bereich der Transplantation des endothelialen Monolayers anwendbar (z.B. DSEK, DMEK), welche gegenwärtig weltweite Verbreitung bei Hornhautchirurgen erfahren (Lombardo et al., 2009). Dieser Ansatz könnte auch bei anderen Arten der Zelltransplantation angewendet werden, wie z.B. bei Stammzellen hergestellt nach dem Verfahren des *Bioengineering* (Hayashi et al., 2009) oder bei der Transplantation von Herzmuskelzellen zur Verbesserung eines angegriffenen Herzmuskels (Shimizu et al., 2009).

Diese Arbeit führte zu neuen Erkenntnissen zu der Bedeutung der anti-apoptotischen Proteine Bcl-xL und p35 hinsichtlich der Verlängerung des Überlebens kornealer

Endothelzellen während der Hornhautkultivierung. Nach bestem Wissen zeigte die Arbeit erstmals, dass das Überleben kornealer Endothelzellen während der Hornhautkultivierung mit Hilfe von Gentherapie verlängert werden kann. Zudem könnte die Anwendung anti-apoptotischer Gentherapie in Hornhautbank vor einer Hornhauttransplantation die Verfügbarkeit von Spenderhornhäuten für Transplantationen steigern. Angesichts des derzeit bestehenden Transplantatmangels könnten dadurch Millionen aufgrund von Hornhauterkrankungen Erblindeter ihre Sehkraft zurückerhalten.

## **VII. Literaturstellen**

1. Abbott, R.L., Fine, M. and Guillet, E (1983). Long-term changes in corneal endothelium following penetrating keratoplasty. A specular microscopic study. *Ophthalmology* 90, 676-685.
2. Adams, J.M. and Cory,S (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.
3. Albon, J., Tullo, A.B., Aktar, S., and Boulton, M.E. (2000). Apoptosis in the endothelium of human corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 2887-2893.
4. Armitage, W.J. and Easty, D.L. (1997) Factors influencing the suitability of organ-cultured corneas for transplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 16-24.
5. Barcia, R.N., Dana, M.R., and Kazlauskas, A. (2007). Corneal graft rejection is accompanied by apoptosis of the endothelium and is prevented by gene therapy with bcl-xL. *Am J Transplant* 7, 2082-2089.
6. Barinaga M (1998). Stroke-damaged neurons may commit cellular suicide. *Science* 281, 1302-1303.
7. Bednarz, J., Teifel, M., Friedl, P., and Engelmann, K. (2000). Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells. *Acta ophthalmologica Scandinavica* 78, 130-136.
8. Beidler, D.R., Tewari, M, Friesen, P.D., Poirier, G, and Dixit, V.M. (1995). The baculovirus p35 protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem* 270, 16526-16528.

9. Bell, K.D., Campbell, R.J., and Bourne, W.M (2000) Pathology of late endothelial failure: late endothelial failure of penetrating keratoplasty: study with light and electron microscopy. *Cornea* 19, 40-46.
10. Bertelmann, E. (2009). Genetic manipulation of corneal endothelial cells: transfection and viral transduction. *Methods in molecular biology* 467, 229-239.
11. Beutelspacher, S.C., Ardjomand, N., Tan, P.H., Patton, G.S., Larkin, D.F., George, A.J., and McClure, M.O. (2005). Comparison of HIV-1 and EIAV-based lentiviral vectors in corneal transduction. *Experimental eye research* 80, 787-794.
12. Beutelspacher, S.C., Pillai, R., Watson, M.P., Tan, P.H., Tsang, J., McClure, M.O., George, A.J., and Larkin, D.F. (2006) Function of indoleamine 2,3-dioxygenase in corneal allograft rejection and prolongation of allograft survival by over-expression. *Eur J Immunol*, 36, 690-700.
13. Borderie, V.M., Baudrimont, M., Vallée, A., Ereau, T.L., Gray, F., and Laroche, L. (2000) Corneal endothelial cell apoptosis in patients with Fuchs' dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41, 2501-2505.
14. Bourges, J.L., Torriglia, A., Valamanesh, F., Benezra, D., Renard, G., and Behar-Cohen, F.F. (2007). Nitrosative stress and corneal transplant endothelial cell death during acute graft rejection. *Transplantation*. 84, 415-23.
15. Bourges, J.L., Valamanesh, F., Torriglia, A., Jeanny, J.C., Savoldelli, M., Renard, G., Benezra, D., De Kozak, Y., and Behar-Cohen, F. (2004). Cornea graft endothelial cells undergo apoptosis by way of an alternate (caspase-independent) pathway. *Transplantation* 78, 316-323.
16. Buchschacher, G.L., Jr., and Wong-Staal, F. (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, 95, 2499-2504.

17. Clapham, D.E. (2007), Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.
18. Clem, R.J. (2001), Baculoviruses and apoptosis: the good, the bad, and the ugly. *Cell Death Differ* 8, 137-143.
19. Crewe, J.M., and Armitage, W.J. (2001). Integrity of epithelium and endothelium in organ-cultured human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1757-1761.
20. Dahm, R. (1999). Lens fibre cell differentiation - A link with apoptosis? *Ophthalmic Res* 31, 163-83.
21. Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., and Reed, J.C. (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.
22. Dobbins, K.R., Price, F.W., Jr., and Whitson, W.E. (2000). Trends in the indications for penetrating keratoplasty in the midwestern United States. *Cornea* 19, 813-816.
23. Ehlers, H., Ehlers, N., and Hjortdal, J.O. (1999) Corneal transplantation with donor tissue kept in organ culture for 7 weeks. *Acta Ophthalmol Scand* 77, 277-278.
24. Fadok, V.A., Voelker, D.R., Campbell, P.A., Cohen, J.J., Bratton, D.L., and Henson, P.M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148, 2207-2216.
25. Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., Dumollard, J.M., Mosnier, J.F., and Campos, L. (2001). In situ immunohistochemical study of Bcl-2 and heat shock proteins in human corneal endothelial cells during corneal storage. *Br J Ophthalmol*, 85, 996-1000.

26. Gain, P., Thuret, G., Chiquet, C., Dumollard, J.M., Mosnier, J.F., Burillon, C., Delbosc, B., Hervé, P., and Campos, L. (2002) Value of two mortality assessment techniques for organ cultured corneal endothelium: trypan blue versus TUNEL technique. *Br J Ophthalmol* 86, 306-310.
27. George, A.J., Arancibia-Cárcamo, C.V., Awad, H.M., Comer, R.M., Fehevari, Z., King, W.J., Kadifachi, M., Hudde, T., Kerouedan-Lebossé, C., Mirza, F., Barbaros Oral, H., Rayner, S.A., Tan, P.H., Tay, E., and Larkin, D.F. (2000) Gene delivery to the corneal endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* 162, S194-200.
28. George, A.J., and Larkin, D.F. (2004). Corneal transplantation: the forgotten graft. *Am J Transplant* 4, 678-685.
29. Goren, M.B. (2006). The Eye Bank Association of America. *Comprehensive ophthalmology update* 7, 261-262.
30. Gong, N., Ecke, I., Mergler, S., Yang, J., Metzner, S., Schu, S., Volk, H.D., Pleyer, U., and Ritter, T. (2007). Gene transfer of cyto-protective molecules in corneal endothelial cells and cultured corneas: analysis of protective effects in vitro and in vivo. *Biochemical and biophysical research communications* 357, 302-307.
31. Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2005). Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99, 119-145.
32. Hayashi, R., Yamato, M., Takayanagi, H., Oie, Y., Kubota, A., Hori, Y., Okano, T., and Nishida, K. (2010). Validation System of Tissue Engineered Epithelial Cell Sheets for Corneal Regenerative Medicine. *Tissue Eng Part C Methods*. 16, 553-560.

33. Heemann, U.W., Tullius, S.G., Tamatami, T., Miyasaka, M., Milford, E., and Tilney, N.L. (1994). Infiltration patterns of macrophages and lymphocytes in chronically rejecting rat kidney allografts. *Transpl Int* 7, 349-355.
34. Helena, M.C., Baerveldt, F., Kim, W.J., and Wilson, S.E. (1998). Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 276-283.
35. Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
36. Hoffer, K.J. (1979). Corneal decomposition after corneal endothelium cell count. *Am J Ophthalmol* 87, 252-253.
37. Hudde, T., Rayner, S.A., Comer, R.M., Weber, M., Isaacs, J.D., Waldmann, H., Larkin, D.F., and George, A.J. (1999). Activated polyamidoamine dendrimers, a non-viral vector for gene transfer to the corneal endothelium. *Gene Ther* 6, 939-943.
38. Jones, G.L., Ponzin, D., Pels, E., Maas, H., Tullo, A.B., and Claerhout, I. (2009). European eye bank association. *Developments in Ophthalmology* 43, 15-21.
39. Joyce, N.C., and Zhu, C.C. (2004). Human corneal endothelial cell proliferation: potential for use in regenerative medicine. *Cornea* 23, S8-S19.
40. Kaiser, H.E., and Bodey, B. (2000). The role of apoptosis in normal ontogenesis and solid human neoplasms. *In vivo* 14, 789-803.
41. Kim, W.J., Mohan, R.R., Mohan, R.R., and Wilson, S.E. (2000). Caspase inhibitor z-VAD-FMK inhibits keratocyte apoptosis, but promotes keratocyte necrosis, after corneal epithelial scrape. *Exp Eye Res* 71, 225-232.
42. Komuro, A., Hodge, D.O., Gores, G.J., and Bourne, W.M. (1999). Cell death during corneal storage at 4 degrees C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 2827-2832.

43. Kown, M.H., Miniati, D.N., Jahncke, C.L., Lijkwan, M.A., Murata, S., Koransky, M.L., Blankenberg, F.G., Strauss, H.W., and Robbins, R.C. (2003). Bcl-2-mediated inhibition of apoptosis in rat cardiac allografts worsens development of graft coronary artery disease. *J Heart Lung Transplant* 22, 986-992.
44. Lai, L.J., Chen, Y.F., Wu, S., Tsao, Y.P., and Tsai, R.J. (2001) Endothelial cell loss induced by phacoemulsification occurs through apoptosis. *Chang Gung Med J* 24, 621-627.
45. Laster, S.M., Wood, J.G., and Gooding, L.R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol* 141, 2629-2634.
46. Leist, M., and Jaattela, M. (2001). Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 589-598.
47. Li, Q.J., Ashraf, M.F., Shen, D.F., Green, W.R., Stark, W.J., Chan, C.C. and O'Brien, T.P. (2001). The role of apoptosis in the pathogenesis of Fuchs endothelial dystrophy of the cornea. *Arch Ophthalmol* 119, 1597-1604.
48. Lombardo, M., Lombardo, G., Friend, D.J., Serrao, S., and Terry, M.A. (2009). Long-term anterior and posterior topographic analysis of the cornea after deep lamellar endothelial keratoplasty. *Cornea* 28, 408-415.
49. Lutz, J., Zou, H., Liu, S., Antus, B., and Heemann, U. (2003), Apoptosis and treatment of chronic allograft nephropathy with everolimus. *Transplantation*, 76, 508-515.
50. Matsuda, M. and Bourne, W.M. (1985). Long-term morphologic changes in the endothelium of transplanted corneas. *Arch Ophthalmol* 103, 1343-1346.
51. McCarey, B.E. and Kaufman, H.E. (1974). Improved corneal storage. *Invest Ophthalmol* 13, 165-173.

52. McMahon, J.M., Conroy, S., Lyons, M., Greiser, U., O'Shea, C., Strappe, P., Howard, L., Murphy, M., Barry, F., and O'Brien, T. (2006). Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. *Stem cells and development* 15, 87-96.
53. Means, T.L., Geroski, D.H., Hadley, A., Lynn, M.J., and Edelhauser, H.F. (1995). Viability of human corneal endothelium following Optisol-GS storage. *Archives of ophthalmology* 113, 805-809.
54. Mergler, S., Pleyer, U., Reinach, P., Bednarz, J., Dannowski, H., Engelmann, K., Hartmann, C., and Yousif, T. (2005). EGF suppresses hydrogen peroxide induced Ca<sup>2+</sup> influx by inhibiting L-type channel activity in cultured human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 80, 285-293.
55. Mergler, S. and Pleyer, U. (2007) The human corneal endothelium: new insights into electrophysiology and ion channels. *Prog Retin Eye Res* 26, 359-378.
56. Mohan, R.R., Mohan, R.R., Kim, W.J., and Wilson, S.E. (2000). Modulation of TNF-alpha-induced apoptosis in corneal fibroblasts by transcription factor NF-kappaB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1327-1336.
57. Moller-Pedersen, T. and Moller, H.J. (1996). Viability of human corneal keratocytes during organ culture. *Acta Ophthalmol Scand* 74, 449-455.
58. Murphy, C., Alvarado, J., Juster, R., and Maglio, M. (1984). Prenatal and postnatal cellularity of the human corneal endothelium. A quantitative histologic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 312-322.
59. Nagy, P., Panyi, G., Jenei, A., Bene, L., Gáspár, R. Jr., Matkó, J., and Damjanovich, S. (1995) Ion-channel activities regulate transmembrane signaling in thymocyte apoptosis and T-cell activation. *Immunol Lett* 44, 91-95.

60. Nakamura, A., Akahane, M., Shigematsu, H., Tadokoro, M., Ohgushi, H., Dohi, Y., Imamura, T., and Tanaka, Y. (2009). Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone* 46, 418-424.
61. Niederkorn, J.Y. (1990). Immune privilege and immune regulation in the eye. *Adv Immunol* 48, 191-226.
62. Olsen, T. and Eriksen, J.S. (1980). Corneal thickness and endothelial damage after intraocular lens implantation. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 58, 773-786.
63. Parker, D.G., Kaufmann, C., Brereton, H.M., Anson, D.S., Francis-Staite, L., Jessup, C.F., Marshall, K., Tan, C., Koldej, R., Coster, D.J., and Williams, K.A. (2007). Lentivirus-mediated gene transfer to the rat, ovine and human cornea. *Gene therapy* 14, 760-767.
64. Patel, S.V., Hodge, D.O., and Bourne, W.M. (2005). Corneal endothelium and postoperative outcomes 15 years after penetrating keratoplasty. *Am J Ophthalmol* 139, 311-319.
65. Pels, E. and Schuchard, Y. (1983). Organ-culture preservation of human corneas. *Doc Ophthalmol* 56, 147-153.
66. Pels, E., Beele, H., and Claerhout, I. (2008). Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *International ophthalmology* 28, 155-163.
67. Pels, E., and Rijneveld, W.J. (2009). Organ culture preservation for corneal tissue. Technical and quality aspects. *Developments in ophthalmology* 43, 31-46.
68. Pleyer, U., Groth, D., Hinz, B., Keil, O., Bertelmann, E., Rieck, P., and Reszka, R. (2001). Efficiency and toxicity of liposome-mediated gene transfer to corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 73, 1-7.

69. Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell death and differentiation* 9, 505-512.
70. Putney, J.W., Jr. and Bird, G.S. (1993). The inositol phosphate-calcium signaling system in nonexcitable cells. *Endocr Rev* 14, 610-631.
71. Rayner, S.A., Larkin, D.F., and George, A.J. (2001). TNF receptor secretion after ex vivo adenoviral gene transfer to cornea and effect on in vivo graft survival. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42, 1568-1573.
72. Redbrake, C., Salla, S., Frantz, A., and Reim, M. (1999)., Metabolic changes of the human donor cornea during organ-culture. *Acta Ophthalmol Scand* 77, 266-272.
73. Rieck, P.W., Gigon, M., Jaroszewski, J., Pleyer, U., and Hartmann, C. (2003) Increased endothelial survival of organ-cultured corneas stored in FGF-2-supplemented serum-free medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 3826-3832.
74. Reim, M., Lax, F., Lichte, H., and Turss, R. (1967). Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aqueous humor, blood and tears in vivo. *Ophthalmologica* 154, 39-50.
75. Riley, M.V. (1969). Glucose and oxygen utilization by the rabbit cornea. *Exp Eye Res* 8, 193-200.
76. Ritter, T., Gong, N. and Pleyer, U. (2005). Is ex vivo adenovirus mediated gene transfer a therapeutic option for the treatment of corneal diseases? *Br J Ophthalmol* 89, 648-649.
77. Robertson, N.M., Zangrilli, J., Fernandes-Alnemri, T., Friesen, P.D., Litwack, G., and Alnemri, E.S. (1997). Baculovirus P35 inhibits the glucocorticoid-mediated pathway of cell death. *Cancer Res* 57, 43-47.

78. Rowan, S., and Fisher, D.E. (1997). Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia* 11, 457-465.
79. Ruusuvaara, P., and Setala, K. (1988). Long-term follow-up of cryopreserved corneal endothelium. A specular microscopic study. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 66, 687-691.
80. Sattler, M., Liang, H., Nettesheim, D., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Eberstadt, M., Yoon, H.S., Shuker, S.B., Chang, B.S., Minn, A.J., Thompson, C.B., and Fesik, S.W. (1997). Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science* 275, 983-986.
81. Schimmelpfennig, B.H. (1982). Evaluation of endothelial viability in human donor corneas. *Arch Ophthalmol.* 100, 472-477.
82. Schultz, R.O., Matsuda, M., Yee, R.W., Glasser, D.B., Sabin, S.M., and Edelhauser, H.F. (1985). Long-term survival of cryopreserved corneal endothelium. *Ophthalmology* 92, 1663-1667.
83. Shawgo, M.E., Shelton, S.N., and Robertson, J.D. (2008). Caspase-mediated Bak activation and cytochrome c release during intrinsic apoptotic cell death in Jurkat cells. *The Journal of biological chemistry* 283, 35532-35538.
84. Shimizu, T., Sekine, H., Yamato, M., and Okano, T. (2009). Cell sheet-based myocardial tissue engineering: new hope for damaged heart rescue. *Current pharmaceutical design* 15, 2807-2814.
85. Streilein, J.W. (1993). Tissue barriers, immunosuppressive microenvironments, and privileged sites: the eye's point of view. *Reg Immunol* 5, 253-268.
86. Summerlin, W.T., Miller, G.E., Harris, J.E., and Good, R.A. (1973). *The organ-cultured cornea: an in vitro study*. *Invest Ophthalmol* 12, 176-180.

87. Thornberry, N.A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
88. Tripathy, S.K., Black, H.B., Goldwasser, E., and Leiden, J.M. (1996). Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2, 545-550.
89. Tsujimoto, Y. (2002). Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep* 22, 47-58.
90. Vasara, K., Setala, K., and Ruusuvaara, P. (1999). Follow-up study of human corneal endothelial cells, photographed in vivo before enucleation and 20 years later in grafts. *Acta Ophthalmol Scand.* 77, 273-276.
91. Waring, G.O., 3rd, Bourne, W.M., Edelhauser, H.F., and Kenyon, K.R. (1982). The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function. *Ophthalmology* 89, 531-590.
92. Wang, X., Appukuttan, B., Ott, S., Patel, R., Irvine, J., Song, J., Park, J.H., Smith, R., and Stout, J.T. (2000). Efficient and sustained transgene expression in human corneal cells mediated by a lentiviral vector. *Gene therapy* 7, 196-200.
93. Williams, K.A., Jessup, C.F. and Coster, D.J. (2004). Gene therapy approaches to prolonging corneal allograft survival. *Expert Opin Biol Ther* 4, 1059-1071.
94. Williams, K.A., Brereton, H.M. and Coster, D.J. (2009) Prospects for genetic modulation of corneal graft survival. *Eye* 23, 1904-1909.
95. Williams, K.A., Lowe, M., Bartlett, C., Kelly, T.L., and Coster, D.J.; All Contributors (2008). Risk Factors for Human Corneal Graft Failure Within the Australian Corneal Graft Registry. *Transplantation* 86, 1720-1724.

96. Wolf, B.B. and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274, 20049-20052.
97. Xu, G., Cirilli, M., Huang, Y., Rich, R.L., Myszka, D.G., and Wu, H (2001). Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex. *Nature* 410, 494-497.
98. Xue, D. and Horvitz, H.R. (1995). Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 377, 248-251.
99. Xue, D., and Horvitz, H.R. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-9 protein is a bifunctional cell-death inhibitor. *Nature* 390, 305-308.
100. Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gönczöl, E., and Wilson, J.M. (1994). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-4411.
101. Zhang, X.Y., La Russa, V.F., and Reiser, J. (2004). Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins. *Journal of virology* 78, 1219-1229.
102. Zhou, Q., Krebs, J.F., Snipas, S.J., Price, A., Alnemri, E.S., Tomaselli, K.J., and Salvesen, G.S. (1998). Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex. *Biochemistry* 37, 10757-10765.
103. Zhu, S., Dekaris, I., Duncker, G., and Dana, M.R. (1999). Early expression of proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha after corneal transplantation. *J Interferon Cytokine Res* 19, 661-669.

## **VIII. Anhang**

### **VIII. 1 Curriculum vitae**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **VIII. 2 Eidesstattliche Erklärung**