

Aus der Klinik für Augenheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Geerling

**Analyse der Effekte des dezellularisierten
humanen und porcinen Limbus auf limbale
epitheliale Stammzellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Deike Caterina Mann

2022

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. S. Schrader

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. C. Suschek

Für meine Großeltern, die immer mit mir mitgefiebert haben.

Und für meine Eltern und Geschwister, für die Ermöglichung aller Optionen und noch so wildesten Träume.

Zusammenfassung

Die limbalen epithelialen Stammzellen (*limbal epithelial stem cells*, LESC) stellen die einzige Regenerationsquelle des Hornhautepithels dar. Sie befinden sich im Limbus, einer Stammzellnische am korneokonjunktivalen Übergang. Kommt es zu einem Versagen dieser Stammzellen (limbale Stammzellinsuffizienz), reichen die klinischen Folgen von Überwachsung der Hornhaut mit Bindehautepithel, Pannus-Bildung und der Entwicklung von Hornhautulzera bis zu einer möglichen Erblindung. Die therapeutischen Optionen bei einer vollständigen bilateralen Limbusinsuffizienz bestehen aus allogenen Limbus-Transplantationen, der allogenen Limbokeratoplastik sowie der Transplantation von *ex-vivo* kultivierten LESC auf eine Trägermatrix. Als Trägermatrix dienen aktuell am häufigsten Amnionmembranen sowie Fibrin-Matrices oder Kollagenschwämme. Die Transplantatabstoßung durch immunologische Prozesse stellt den häufigsten Grund eines Therapieversagens dar, ebenfalls beeinflusst die Ausdifferenzierung der Stammzellen nach Expansion das Ergebnis der Therapie negativ. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf das Erforschen einer alternativen Trägermatrix, welche die LESC physiologisch reguliert und ihren Phänotyp erhalten soll, gleichzeitig aber nur ein geringes, bis kein immunologisches Potential aufweist. Dafür wurden der humane und porcine Limbus dezellularisiert, mit *ex-vivo* kultivierten humanen LESC reepithelialisiert und die LESC mittels Proliferationsassay, immunhistochemischen Färbungen und quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion analysiert. Es zeigte sich, dass die Expansion von LESC auf dezellularisiertem humanem und porcinen Limbus möglich ist, wobei eine Expansion auf humanem Limbus erfolgreicher war als auf dem porcinen Limbus. Es bildete sich ein mehrschichtiges Epithel aus, welches über drei Wochen erhalten blieb. Der Limbus bewahrte zudem die Stammzeleigenschaften der Zellen während der gesamten Versuchsdauer. Zusätzlich zeigte sich, dass sich die Zellen auf beiden Konstrukten vergleichbar zur Kontrolle vermehrten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass sowohl der humane als auch der porcine dezellularisierte Limbus eine potentielle Trägermatrix für die *ex-vivo* Expansion und Transplantation von LESC darstellen, welche zur Therapie einer bilateralen Limbusinsuffizienz genutzt werden könnten. In zukünftigen Studien sollten die vorliegenden Ergebnisse in Tierversuchen verifiziert werden, um die Nutzung als mögliche Therapie weitergehend zu erforschen.

Abstract

The limbal epithelial stem cells (LESC) are the main source of regeneration of the corneal epithelium. They are located in the limbus, a stem cell niche at the corneoconjunctival junction. The clinical consequences of stem cell loss or failure (limbal stem cell insufficiency) range from neovascularization and corneal erosion to blindness. The therapeutic options for bilateral limbal insufficiency comprise allogeneic limbus transplantation, allogeneic limbokeratoplasty or the transplantation of allogeneic *ex-vivo* matrix-cultured LESC. To date, the most frequently used carrier constructs are amniotic membranes, but also fibrin-matrices or collagen sponges are used. Graft rejection due to immunological processes is one of the most common reasons for therapy failure. Additionally, the differentiation of stem cells after expansion also influences the outcome of the therapy negatively. This work focuses on the investigation of a new carrier matrix that can regulate the LESC physiologically and can maintain their stem cell phenotype, but at the same time has a low or no immunological potential. Therefore, human and porcine limbus were decellularized and re-epithelialized with *ex-vivo* cultivated human LESC. After that the stem cells were analyzed by proliferation assays, immunohistochemical staining and real-time quantitative polymerase chain reaction. It was shown that it is possible to expand LESC on decellularized human and porcine limbus with the human limbus showing a higher success rate than the porcine limbus during expansion. A multilayered epithelium formed that was stable for up to three weeks. The limbus preserved the stem cell properties for three weeks and the proliferation potential was preserved on the corneal tissue. In addition, cells on both constructs were shown to proliferate comparably to the control. Both the human and porcine decellularized limbus seem to represent a possible carrier matrix for the *ex-vivo* expansion of LESC, which could be transplanted for the treatment of bilateral limbal insufficiency. In future studies, *in vivo* experiments are necessary in order to evaluate its full potential as a carrier matrix.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	dpt	Dioptrien
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ABC	<i>ATP Binding Cassette</i> / ATP-bindende Kassette	EGF	<i>Epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor
ALI	<i>air liquid interface</i> / Luft-Flüssigkeits-Grenze	et al.	<i>et altera</i> / und andere
alpha1,3GT	Alpha1,3galactosyltransferase	EZM	Extrazellulärmatrix
AM	Amnionmembran	FBS	Fetales bovines Serum
Aqua dest.	Destilliertes Wasser	g	Gramm
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i> / Komplementäre Desoxyribonukleinsäure	Gal-alpha	Alpha1-3Galbeta1-(3)4GlcNAc-
CK	Cytokeratin	HE	Hämatoxylin und Eosin
D	Tag	HPF	<i>high-power field</i> / Gesichtsfeld
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol	Kap.	Kapitel
DKS	Donkey serum	LESC	<i>limbal epithelial stem cells</i> / limbale epitheliale Stammzellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium	LSCD	<i>limbal stem cell deficiency</i> / limbale Stammzellinsuffizienz
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure	M	Molar (mol / l)
DNase	Desoxyribonuklease	min	Minute
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphate	MMC	Mitomycin C
		P/S	Penicillin / Streptomycin

PBS	<i>Phosphate buffered saline /</i> Phosphatgepufferte Salzlösung	rpm	<i>Revolutions per minute /</i> Umdrehungen pro Minute
		s	Sekunde
qrt-PCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction /</i> quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	SD	Standardabweichung
		SLET	<i>Simple limbal epithelial transplantation</i>
		Tab.	Tabelle
rcf	<i>Relative centrifugal force /</i> Relative Zentrifugalbeschleunigung	UV	Ultraviolett
		WST	<i>Water soluble tetrazolium</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid /</i> Ribonukleinsäure	2D	zwei-dimensional
		3D	drei-dimensional

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ANATOMISCHER AUFBAU DES LIMBUS	1
1.2	LIMBALE EPITHELIALE STAMMZELLEN	3
1.2.1	<i>Marker der limbalen epithelialen Stammzellen</i>	4
1.3	LIMBALE STAMMZELLINSUFFIZIENZ	5
1.4	THERAPEUTISCHE OPTIONEN DER LIMBALEN STAMMZELLINSUFFIZIENZ	6
1.5	VERWENDUNG VON DEZELLULARISIERTEM GEWEBE ZUR GEWEBEZÜCHTUNG	10
1.6	PORCINES GEWEBE ALS MATRIX	12
1.7	GRUNDLAGE DER ARBEIT	13
1.8	ANFORDERUNGEN AN EINE TRÄGERMATRIX FÜR LESC	15
1.9	ZIEL UND THESEN DER ARBEIT	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	MATERIAL	17
2.1.1	<i>Chemikalien, Medien und Reagenzien</i>	17
2.1.2	<i>Puffer und Lösungen</i>	19
2.1.3	<i>Kits</i>	20
2.1.4	<i>Enzyme</i>	20
2.1.5	<i>Oligonukleotide</i>	20
2.1.6	<i>Antikörper</i>	21
2.1.7	<i>Zelllinien</i>	21
2.1.8	<i>Software</i>	22
2.2	METHODEN	23
2.2.1	<i>Gewebebegewinnung</i>	23
2.2.1.1	Dezellularisierung der humanen und porcinen Kornea	24
2.2.2	<i>Zellkultur</i>	24
2.2.2.1	Feederlayer	25
2.2.2.2	Isolierung und Kultivierung von LESC	26
2.2.2.3	Re-Besiedlung der dezellularisierten Korneae mit LESC	26
2.2.2.4	Kultivierung der re-epithelialisierten dezellularisierten Korneae	27
2.2.2.5	WST-1-Proliferationsassay	27
2.2.3	<i>Histologische Aufarbeitung</i>	28
2.2.3.1	DNA-Nachweis nach Feulgen	29
2.2.3.2	Hämatoxylin und Eosin-Färbung	30
2.2.3.3	Auswertung der histologischen Färbungen	30
2.2.3.4	Immunhistochemische Färbung	30
2.2.3.5	Auswertung der immunhistochemischen Färbungen	32
2.2.4	<i>Molekularbiologische Aufarbeitung</i>	32
2.2.4.1	RNA-Isolierung	32
2.2.4.2	Umschreibung mRNA in cDNA	33
2.2.4.3	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR)	33

2.2.4.4	Auswertung der qrt-PCR	34
2.2.5	<i>Statistische Analyse</i>	34
2.2.5.1	Unabhängige Variablen	34
2.2.5.2	Abhängige Variablen.....	35
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	VORAUSSETZUNGEN UND VORWEGNEHMENDE ERLÄUTERUNGEN.....	38
3.2	DURCHFÜHRBARKEIT DER RE-EPITHELIALISIERUNG VON DEZELLULARISIERTEM HUMANEN UND PORCINEN LIMBUS MIT LESC	39
3.3	MEHRSCHICHTIGKEIT DES NEUEN KORNEALEN EPITHEL.....	46
3.4	ERHALT DER PROGENITORZELLEIGENSCHAFTEN.....	49
3.4.1	<i>Immunhistochemische Färbung</i>	49
3.4.2	<i>quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion</i>	65
3.5	PROLIFERATIONSEINFLUSS DURCH DIE TRÄGERMATRIX - VERGLEICH ZWISCHEN DEZELLULARISIERTEN KORNEAE UND KUNSTSTOFF	68
4	DISKUSSION.....	71
4.1	DIE VERWENDUNG VON DEZELLULARISIERTEM GEWEBE.....	72
4.2	RE-BESIEDLUNGSMETHODEN	76
4.3	DER DEZELLULARISIERTE HUMANE UND PORCINE LIMBUS ERHALTEN DIE STAMMZELLEIGENSCHAFTEN VON LESC NACH RE-EPITHELIALISIERUNG.....	77
4.4	DIE KULTIVIERUNGSART HAT KEINEN EINFLUSS AUF EINE EPITHEL-STRATIFIZIERUNG UND DEN ERHALT DER STAMMZELLEIGENSCHAFTEN.....	81
4.5	DIE DEZELLULARISIERTE KORNEA ERHÄLT DAS PROLIFERATIONSVERHALTEN VON LESC	83
4.6	DER DEZELLULARISIERTE HUMANE UND PORCINE LIMBUS UNTERSCHIEDEN SICH NICHT IN BEZUG AUF EXPANSION UND KULTIVIERUNG VON LESC.....	85
4.7	WISSENSCHAFTLICHE IMPLIKATIONEN	87
4.8	AUSBlick.....	87
4.9	LIMITATIONEN.....	88
5	LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	90
6	ANHANG	99
6.1	GERÄTE	99
6.2	VERBRAUCHSMATERIAL.....	100
6.3	MITTELWERTVERGLEICHE DER SCHICHTANZAHL	100
6.4	EINFLUSSFAKTOR AUF DIE PROTEINEXPRESSION VON LESC NACH RE-EPITHELIALISIERUNG.....	102
6.5	ANTEILE DER ANTIKÖRPER-POSITIVEN ZELLEN NACH RE-EPITHELIALISIERUNG.....	104
6.6	EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE GENEXPRESSION VON LESC NACH RE-EPITHELIALISIERUNG ..	108
6.7	GENEXPRESSIONS-VERGLEICHE VON LESC ZWISCHEN PROBEN UND KONTROLLE	109
6.8	MITTELWERTVERGLEICHE DES PROLIFERATIONSVERHALTENS	111

1 Einleitung

Die Qualität unseres Sehens bestimmt unser Leben. Eine gesunde Kornea ist dabei unabdingbar für einen guten Visus. Die Kornea besteht aus dem außen liegenden Epithel mit der darunterliegenden Bowman-Membran, dem kornealen Stroma, sowie der Descemet-Membran mit dem innen liegenden Endothel [1]. Eine wichtige Aufgabe der Kornea ist die Lichtbrechung, so macht sie mit circa +43 Dioptrien (dpt) zwei Drittel der Gesamtbrechkraft des Auges (+60 dpt) aus [1]. Das korneale Epithel ist dabei essentiell für die Transparenz der Hornhaut [2]. Zusätzlich schützt es die Hornhaut vor Pathogenen und hat einen positiven Effekt auf korneale Nerven, weswegen es für die gesamte Integrität der Hornhaut verantwortlich ist [3].

Das korneale Epithel gehört zu den sich am schnellsten regenerierenden Epithelien des Körpers; innerhalb von ein bis zwei Wochen kommt es zu einer vollständigen Erneuerung [2]. Diese effiziente Regeneration gewährleistet ein funktionstüchtiges Gewebe. Als einzige Regenerationsquelle des Epithels dienen die limbalen epithelialen Stammzellen (*limbal epithelial stem cells*, LESC), die sich im Limbus befinden [4-7]. Dieser ist eine anatomische und strukturelle Grenze zwischen Kornea und Konjunktiva und bildet die Stammzellnische der LESC (Abb.1).

1.1 Anatomischer Aufbau des Limbus

Der Limbus ist eine komplexe anatomische Struktur mit einer spezialisierten Mikroumgebung, bestehend aus zellulären und extrazellulären Anteilen (Abb. 2). Dieses Mikromilieu ermöglicht einen engen Kontakt und Zell-Zell-Interaktionen zwischen LESC und Nischenfaktoren wie Stromazellen, Blutgefäßen und Nerven, wodurch eine Differenzierung der Stammzellen verhindert wird [8-11]. In der Extrazellulärmatrix findet sich eine hohe Konzentration von Melanozyten, limbalen Fibroblasten und Immunzellen, bestehend aus Langerhans Zellen, Lymphozyten und Makrophagen [11, 12]. Dabei erfüllt jede Komponente eine eigene wichtige Aufgabe; so dienen beispielsweise die Melanozyten dem Schutz vor UV-Strahlung und den dadurch entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies, während die limbalen Fibroblasten für die LESC-Adhäsion zuständig sind [8].

Lokalisation und schematische Darstellung des Limbus corneae

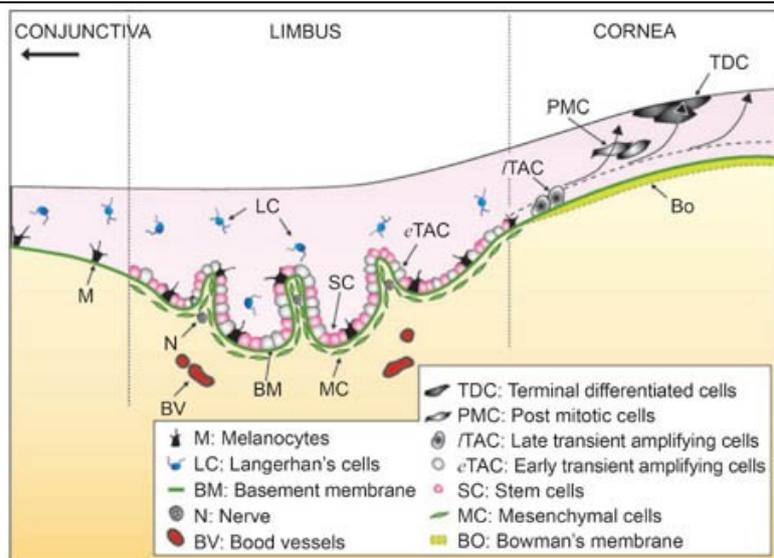
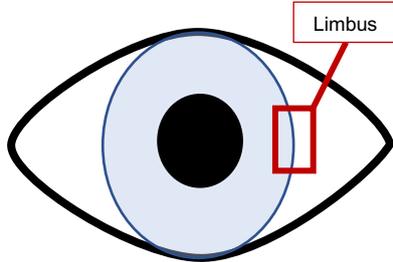


Abb. 1: Lokalisation des Limbus im Auge.

Abb. 2: Aufbau des Limbus, seine Struktur und die Mikroumgebung. (Abbildung aus [13]; mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature, Lizenznummer 4995831280107, *Licensed Content Title* „Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus“, *Licensed Content Author* Wei Li et al.)

Ein weiterer Einflussfaktor bei der Regulation der Stammzellen ist die Basalmembran. Durch sie wird das Vorkommen von spezifischen Wachstumsfaktoren sowie von Zytokinen beeinflusst, welche die Stammzellen für den Erhalt ihrer Eigenschaften benötigen [14]. Zu diesen Wachstumsfaktoren gehören unter anderem der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der Nervenwachstumsfaktor, der Keratinozyten-Wachstumsfaktor, sowie Zytokine wie Interleukin-6, die an Rezeptoren auf der Oberfläche der LESC binden und wirken [9]. Unterhalb der Basalmembran befinden sich zahlreiche Blutgefäße, wodurch sich der Limbus von der avaskulären Kornea unterscheidet [8]. Die starke Vaskularisation sichert eine ausreichende Versorgung der LESC mit Sauerstoff, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und weiteren Nährstoffen [15]. Durch hereinragende Stromapapillen und eine Fenestrierung der Basalmembran ist eine enge Interaktion mit umgebenden Stromazellen gewährleistet [8, 9].

Die LESC befinden sich im Limbus in einem Kryptenrelief, den sogenannten Vogt-Palissaden (Abb. 3) [8]. Dies sind zapfenförmige, radial entlang des Limbus ausgerichtete Stromapapillen [16]. Die Lage in den Krypten dient dem Schutz vor mechanischer Belastung (Scherkräfte) [9, 15] sowie vor externen Schädigungen, da schädliche Substanzen erst in die Krypten eindringen müssen, bevor die Stammzellen erreicht werden [8, 9]. Beim Menschen befinden sich in den durch das Ober- und Unterlid geschützten superioren und

inferioren Anteilen des Limbus größere Mengen an LESC als in den temporalen und nasalen Anteilen [2, 15, 16].

Darstellung der Vogt-Palisaden mittels optischer Kohärenztomographie

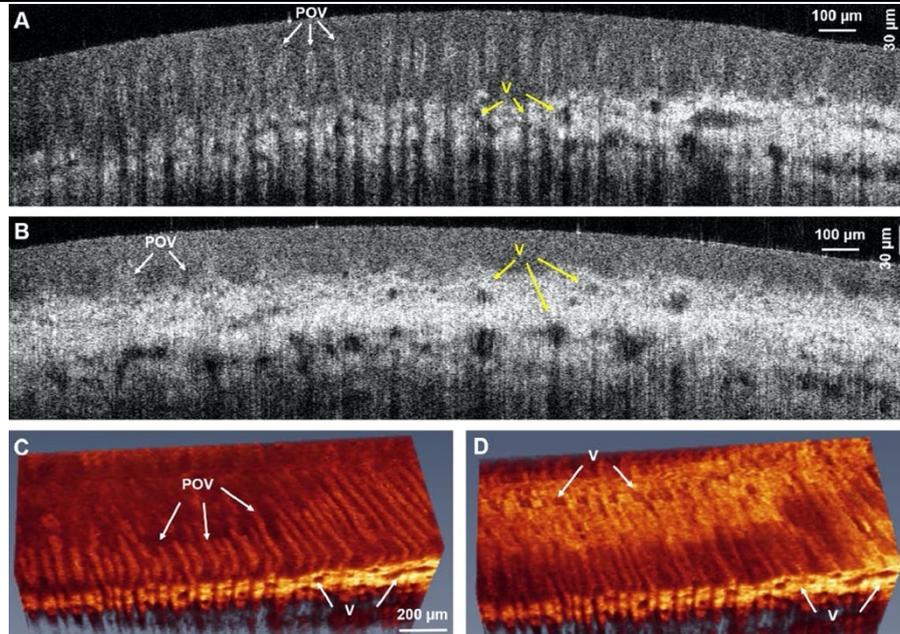


Abb. 3: POV = Vogt-Palisaden; V = Blut- und Lymphgefäße (Abbildung aus [17]; mit freundlicher Genehmigung von Bizheva et al. (2017) © The Optical Society.)

1.2 Limbale epitheliale Stammzellen

LESC weisen einen undifferenzierten Phänotyp mit einer verringerten Zellgröße und einem Kern-Zytoplasma-Verhältnis zugunsten des Kernes auf. Ebenfalls fehlt die Expression von terminalen Differenzierungsmarkern wie Cytokeratin (CK) 3 und 12 [8]. Durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zugleich geringer Teilungsrate *in vivo* bei einer hohen proliferativen Kapazität *in vitro* erfüllen sie die Kriterien von Stammzellen [9, 18]. Sie zählen zu den unipotenten adulten, gewebespezifischen Stammzellen, welche sich zu funktionellen Epithelzellen terminal differenzieren [9].

Als Progenitorzellen zeichnen sie sich durch eine geringe Teilungsgeschwindigkeit aus. Thoft und Friend beschrieben 1983 das so genannte „X, Y, Z-Modell“ bezüglich der Hornhaut-Homöostase [19]. Dieses besagt, dass durch das Gleichgewicht von drei unabhängigen Faktoren ($X + Y = Z$) ein gesundes Wachstum der Kornea erzielt wird. Im Falle eines Ungleichgewichts kommt es zu einer Degeneration der Kornea. X bezeichnet dabei die Proliferation der basalen Epithelzellen, Y die zentripetale Migration der peripheren Limbuszellen in Richtung zentraler Hornhaut und Z das Abschilfern toter Zellen. Detailliert

bedeutet dies, dass sich die LESC asymmetrisch in der Limbusregion teilen (Variable X) (Abb. 4). Eine Tochterzelle verbleibt mit erhaltenen Stammzeleigenschaften im Limbus, während die andere Tochterzelle unter der sich ändernden Mikroumgebung zu einer transient amplifizierenden Zelle (*Transient Amplifying Cell*) wird und Richtung zentraler Kornea migriert [8, 20]. Unter weiterer Differenzierung wandern diese Zellen entlang der Basalmembran und bilden schließlich unter Ausdifferenzierung das fünf- bis sieben-schichtige Korneaepithel [5, 21-23]. Dieser Vorgang wird zentripetale Migration genannt (Variable Y) [8]. Im späteren Verlauf flachen sie von basalen zylindrischen Zellen zu superfiziellen Zellen ab (Variable Z), werden abgeschilfert und über den Tränenfilm abgetragen [5, 24]. LESC bewegen sich nicht nur nach zentripetal, sie haben noch ein zweites Bewegungsmuster; eine suprabasale Bewegung ermöglicht eine anatomische Barriere zwischen Binde- und Hornhaut [25]. Außerdem haben sie die besondere Eigenschaft, ihr Proliferationspotential in Folge eines Verletzungsreizes zu erhöhen, um eine Regeneration des kornealen Epithels zu ermöglichen [8, 18].

Darstellung der zentripetalen Migration limbalen epithelialer Stammzellen

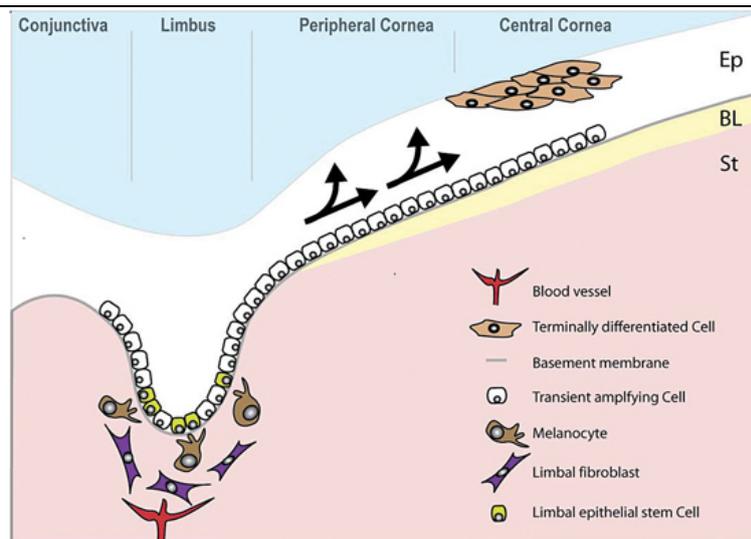


Abb. 4: Nach asymmetrischer Teilung in der basalen Schicht des Epithels (Ep) und unter Migration in Richtung zentraler Kornea (Pfeil) wird eine Tochterzelle zu einer transient amplifizierenden Zelle (*Transient Amplifying Cell*). Unter weiterer Differenzierung wird das auf der Bowman-Schicht (BL) liegende Epithel regeneriert. (Abbildung aus [26], Copyright 2009 Genevieve A. Secker und Julie T. Daniels. Open-access article [27], geöffnet am 04.12.2020)

1.2.1 Marker der limbalen epithelialen Stammzellen

In den letzten Jahren wurden verschiedene spezifische Marker für die LESC aufgedeckt [28]. Diese können in drei Gruppen eingeteilt werden [5]. Als Hauptvertreter der (1)

Transkriptionsfaktoren gilt p63. Dieser wurde erstmals 2001 von Pellegrini et al. als potentieller Marker vorgestellt [29], allerdings ist dieser auch in angrenzenden basalen kornealen Zellen zu detektieren [5]. Die Isoform $\Delta Np63\alpha$ scheint spezifischer für LESC zu sein [30, 31]. Zu den (2) Zellmembran- und Transmembranproteine gehören Integrin- $\beta 1$ und Integrin- $\alpha 9$, ebenso wie die zu der Familie der ATP-Transporter gehörenden Transportproteine *ATP Binding Cassette (ABC) Subfamily B Member 5 (ABCB5)* und *ABC Subfamily G Member 2 (ABCG2)* [20, 31-33]. Die ABC-Proteine stellen generelle Marker für Stammzellen dar [33]. Der epitheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) wird ebenfalls als stammzell-assoziiertes Marker benutzt [5]. Als letzte Gruppe gelten (3) zytoplasmatische Proteine wie das zytoskelettale Intermediärfilament Keratin 19, α -Enolase [5] und CK 15 [25, 34].

Chen et al. konnten negative Marker identifizieren, welche lediglich in ausdifferenzierten kornealen Epithelzellen sowie in konjunktivalen Zellen exprimiert werden. Dazu gehören CK 3 und 12, E-Catherin und Involucrin [5, 32, 35]. Dabei sind CK 3 und 12 spezifische korneale Differenzierungsmarker, die nur im kornealen ausdifferenzierten Epithel und nicht in limbalen Vorläuferzellen vorkommen [6, 8].

1.3 Limbale Stammzellinsuffizienz

Durch eine Schädigung des Limbus und der LESC verliert dieses effektive Regenerationssystem an Funktion - es kommt zu einer limbalen Stammzellinsuffizienz (*limbal stem cell deficiency, LSCD*) [8, 24]. Je nach Schweregrad der LSCD bildet sich ein unterschiedlicher Beschwerdekomples. Die milde Form kann lange subklinisch bleiben, hier zeigt sich lediglich eine Veränderung der limbalen Architektur mit Verlust der Vogt-Palisaden [5]. Bei hohen Schweregraden der Erkrankung kann eine korneale Regeneration und damit einhergehend eine Wundheilung nicht mehr stattfinden. Durch den Barriereverlust zwischen Kornea und Konjunktiva kann es zu einem Überwachsen der Kornea mit konjunktivalen Zellen oder einem vaskularisierten Pannus (Konjunktivalisation) kommen [36]. Durch die Bildung des neuen Epithels durch konjunktivale Zellen treten zusätzlich oberflächliche Hornhautvaskularisationen auf [37]. Bei fehlender Regeneration der Epithelzellen kommt es zu rezidivierenden Erosionen und daraus resultierenden Ulzerationen, welche zu einer Trübung der Kornea und schlussendlich zum Visusverlust führen können [8]. Die Patienten klagen über ein Fremdkörpergefühl in dem betroffenen Auge (hervorgerufen durch Erosionen) sowie über Schmerzen, Photophobie, Augenrötungen und Epiphora [5]. Schwere

Entzündungen der Kornea mit anschließender Vernarbung des betroffenen Stromaanteils können zu einer Hornhautperforation führen [5].

Die Einteilung der LSCD erfolgt in primär und sekundär. Der primären LSCD liegen hereditäre Ursachen wie die Aniridie oder die angeborene *Erythrokeratoderma variabilis* zugrunde [5, 8, 25]. Die häufiger vorkommenden sekundären LSCD sind erworben [25]. Dazu zählen die traumatische Zerstörung der LESC, vor allem durch thermale oder chemische Traumata oder die missbräuchliche Nutzung von Kontaktlinsen. Seltener führen limbale Neoplasien, mikrobielle Infektionen oder iatrogene Gründe zu diesem Krankheitsbild [2, 5]. Autoimmune Prozesse wie bei dem Stevens-Johnson-Syndrom oder einem okulären vernarbenden Pemphigoid stellen die häufigste Ursache beidseitiger LSCD dar, aus Verätzungen resultieren meist einseitige Insuffizienzen [25].

Die Diagnose einer LSCD basiert auf Anamnese und klinischer Untersuchung. In der Untersuchung mittels Spaltlampe zeigt sich ein irregulärer Reflex, die Kornea präsentiert sich undurchsichtig und von variabler Dicke [38]. Je nach Schweregrad der Erkrankung ist der Verlust der limbalen Anatomie, Neovaskularisationen sowie eine korneale Konjunktivalisation erkennbar. Persistierende Epitheldefekte, chronische Entzündungen und stromales Narbengewebe können ebenfalls beobachtet werden [39]. Mit einer klinischen Untersuchung wird festgestellt, ob die gesamte Hornhautoberfläche oder nur spezifische Sektoren betroffen sind [5, 39]. Hilfreich ist häufig ein Anfärben der kornealen Oberfläche mit Fluoreszin oder Bengal-Rosa, wodurch der Zustand der Zellen der Augenoberfläche dargestellt werden kann [39]. Bei einer LSCD kommt es zu dem Verlust des kornealen Epithels und einem Überwiegen des konjunktivalen Epithels, welches sich durch das Vorkommen von Becherzellen sowie durch die vermehrte Expression von CK 3-negativen und CK 19-positiven Zellen gekennzeichnet ist und mittels Impressionszytologie nachgewiesen werden kann [15, 39]. Ebenfalls können eine *in vivo* konfokale Mikroskopie oder eine optische Kohärenztomographie zur Diagnosesicherung durchgeführt werden. Sie dienen zusätzlich der Quantifizierung der Erkrankung und der damit einhergehenden Therapieplanung.

1.4 Therapeutische Optionen der limbalen Stammzellinsuffizienz

Grundlage der Behandlung ist die Übertragung gesunder LESC und / oder die Rekonstruktion der Stammzellnische [40]. Die Art und der Erfolg der Therapie hängen unter anderem von dem Ausmaß der Stammzellschädigung und von der Ausprägung ab [25]. Bei einer unilateralen, partiellen LSCD, bei der noch funktionsfähige LESC im Limbus vorliegen,

kann zunächst eine konservative Therapie unternommen werden. Supportive Maßnahmen wie Tränenersatzmittel und ein Debridement des Bindehautepithels können hier zu einem Erfolg führen. Dabei wird angenommen, dass die freien Stammzellnischen durch benachbarte, sich teilende und migrierende LESC re-besiedelt werden [25]. Chirurgische Ansätze, wie die Kombination aus Debridement und einer Amnionmembrantransplantation, zeigen hier zum Teil gute Erfolge bei der Wundheilung einer defekten Augenoberfläche [15, 25].

Sind keine funktionstüchtigen LESC mehr vorhanden, ist eine erweiterte operative Therapie die einzige verbleibende Option. Eine klassische Keratoplastik ist hierbei allerdings nicht ausreichend. Diese führt anfänglich zu einer transienten Verbesserung der Symptome, durch die fehlenden Stammzellen und damit der fehlenden Regeneration des Epithels kann es jedoch schnell zu einer erneuten Konjunktivalisation kommen sowie zu einem Ausbleiben der Epithelialisierung des Transplantates [41]. Studien konnten zeigen, dass eine Transplantation der Stammzellen direkt auf die Augenoberfläche (die sogenannte „*Simple limbal epithelial transplantation (SLET)*“) kurzfristig bei 78 - 84% der Patienten zu einem vollständigen Epithelschluss führt, jedoch nur bei 69% eine Verbesserung des Visus brachte [42, 43]. Besteht zusätzlich eine Entzündung im Auge, ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass die LESC ihre Stammzeleigenschaften rasch verlieren [44-46]. Kenyon und Tseng stellten 1998 den ersten therapeutischen Versuch der Behandlung einer unilateralen LSCD mittels autologer Transplantation eines Limbusteilstücks samt Stammzellen aus dem gesunden, kontralateralen Auge vor. Nach der Entfernung von Limbusnarbengewebe am erkrankten Auge, wurden zwei Teilstücke Limbusgewebe aus dem gesunden Auge entnommen und auf das beschädigte Auge transplantiert [47]. Um eine iatrogen bedingte LSCD zu verhindern, darf nicht zu viel Limbusgewebe aus dem Spenderauge entnommen werden [5]. Die Langzeitprognosen für die autologe, lamelläre Limbustransplantation sind vielversprechend, solange keine Entzündung am Auge vorliegt [48].

Um Gewebe einzusparen, wurde die *ex-vivo* Kultivierung von LESC aus einer Biopsie des gesunden Limbus etabliert [37]. 1997 haben Pellegrini et al. eine *ex-vivo* Kultivierung von LESC zu sogenannten Holoklonen etabliert [49]. Weiterführend wurden *ex-vivo* kultivierte LESC auf verschiedenen Trägermatrices übertragen und transplantiert [2, 50, 51]. Seit 2015 gibt es mit Holoclar® die erste zugelassene Stammzelltherapie gegen LSCD in Europa. Dies sind auf einer Fibrinmembran aufgetragene, *ex-vivo* expandierte, autologe humane korneale Epithelzellen, die durchschnittlich 3,5% LESC enthalten. Die

Transplantation von Holoclar® dient der Therapie von LSCD, welche durch Verbrennungen oder Verätzungen verursacht wurde und zeigt eine Erfolgsrate zwischen 62,5 und 80,5 % bei niedrigem Nebenwirkungsprofil [52, 53]. Zwölf Monate nach Transplantation hatten 73,1% der Patienten keine oder milde korneale Neovaskularisationen, 83,6% keine oder kaum epitheliale Defekte und 49% eine Verbesserung der Sehschärfe. Nach 12 Monaten hatten 31,7% der Patienten eine Entzündung mit limbalen Hyperämie [53]. Diese Daten sind vielversprechend, zeigen jedoch durch die hohe Inflamationsrate bei gleichzeitig inkonsistenter Visusverbesserung, dass es wichtig ist, weitere Wachstumssubstrate mit einer besseren Langzeitprognose aufzudecken.

Als weitere Therapieoptionen werden aktuell als Trägermatrices für die LESC am häufigsten Amnionmembranen (AM), Fibrin-Matrices sowie Polymere oder Kollagenschwämme genutzt [41]. Für die LESC-Gewinnung wird ein 1 x 2 mm großes Stück Limbusgewebe vom Patienten gewonnen, welches anschließend im Labor aufgearbeitet wird [54-58]. Untersuchungen von AM als Transplantationsmatrix haben trotz erster positiver Ergebnisse in der *ex-vivo* Expansion von LESC gezeigt, dass diese nicht ideal für die Stammzelltransplantation geeignet ist. Sie verhindert eine vorzeitige Ausdifferenzierung der LESC in der initialen Phase, jedoch kommt es bei längerer Kultivierungsdauer zu einem progressiven Verlust der Stammzeleigenschaften [54, 55]. Zusätzlich unterliegt sie einer hohen Spendervariabilität, so dass es zu einer Heterogenität in der Gewebequalität kommen kann. Auch innerhalb einer Spender-AM kann es zu großen Unterschieden hinsichtlich der Dicke und Stabilität kommen. Da es sich bei der AM um Spendergewebe bei elektiven Kaiserschnitten handelt, liegt eine eingeschränkte Verfügbarkeit des Materials vor [59]. Ebenfalls wird die Verwendung durch regulatorische Hürden durch das Transplantationsgesetz limitiert, wie beispielsweise die aktive Zustimmung zur Entnahme durch die Patientin oder das Beantragen verschiedener Genehmigungen zur Entnahme von Gewebe sowie strenge Richtlinien im Hinblick auf die Gewebeerarbeitung [60, 61]. Weiterhin muss jede AM vor Nutzung einem kosten- und zeitintensiven Screen auf mögliche Infektionen unterzogen werden. Auch der Erfolg der Therapie ist großen Schwankungen unterlegen und variiert zwischen 50 und 83%, da die limbale Barriere langfristig häufig nicht wiederhergestellt werden konnte [50, 62, 63].

Die Verwendung von Fibrin-Matrix, eine Kombination von Fibrinogen und Thrombin, bietet durch seine Eigenschaft als schnell abbaubares, natürliches Substrat die Möglichkeit der Transplantation trägerfreier Epithelverbände [64, 65]. Da beide Bestandteile menschlichen Ursprungs sein können, kann es als autologes biotechnologisch hergestelltes Gewebe

genutzt werden. Han et al. fanden jedoch in Fibringel kultivierten Stammzellen eine Expression von CK 3 [66], was auf eine partielle Differenzierung der Zellen hinweist [59].

Das Hornhautstroma besteht zu einem großen Anteil aus Kollagen, weswegen die Verwendung von Kollagen als Trägermatrix nahe liegt. Es ist biokompatibel, hat eine geringe Immunogenität und kann kostengünstig hergestellt werden [59]. Durch den hohen Wasseranteil des Kollagens, ist es eine instabile Matrix. Die Stabilität kann durch künstliche Vernetzung erhöht werden [67]. Die dafür verwendeten Vernetzer wie beispielsweise Carbodiimid zeigten in Studien, dass die Transmission und der Brechungsindex der künstlichen Matrix ähnlich der der nativen Kornea ist. Die Zytotoxizität des Vernetzers, die Verringerung biomimetischer Eigenschaften und das Verhindern des Umbaus des Gerüsts auf Zellbasis, sind allerdings potentielle Nachteile [59, 68, 69]. Jedoch fehlt auch bei solchen Matrices bisher eine Stammzellnische, um die Stammzeleigenschaften langfristig zu erhalten. Hier werden aktuell erste Studien durchgeführt, in denen in ein Kollagengel mittels eines Stempelsystems eine limbus-ähnliche Struktur eingebracht werden soll [70].

Bei der Therapie der bilateralen LSCD kommen lediglich allogene limbale Stammzellen (von Familienmitgliedern oder Organspendern [5]) oder autologe Stammzellen der oralen Mukosa als Quelle der Regeneration in Frage [2, 71, 72]. Hier wird entweder eine allogene Limbus-Transplantation, eine allogene Limbokeratoplastik (Transplantation einer Spenderkornea samt Stammzellen) oder eine Transplantation *ex-vivo* kultivierter allogener Limbusstammzellen, aufgetragen auf eine Trägermatrix, durchgeführt.

Der allgemeine Therapieerfolg bei einer LSCD mit Transplantation kultivierter LESC, basierend auf der kompletten Wiederherstellung des kornealen Epithels, beträgt 76%. Dabei liegt der Erfolg von autologen Transplantationen bei einer unilateralen LSCD bei 77% und der von allogenen Transplantationen bei einer bilateralen LSCD bei 73%. 50% haben eine Verbesserung ihres Visus von ≥ 2 Zeilen des Snellen-Index [15, 73-75]. Studien zeigten, dass es hauptsächlich in den ersten zwei Jahren zu einem Therapieversagen kommt, anschließend bleibt die Erfolgsrate konstant [57, 76]. Allerdings ist aufgrund der Vielzahl der auf den Therapieerfolg einwirkenden Variablen (verwendete Kulturmethoden, die Transplantationstechnik sowie die Messung des subjektiven und objektiven Erfolgs) eine verlässliche Aussage über diesen schwierig [73]. Der Erfolg ist unter anderem von dem immunologischen Potential des Transplantats und von der Anzahl der transplantierten LESC und deren Phänotypen abhängig [74]. Die derzeitigen Behandlungsoptionen weisen in diesen Punkten Defizite auf. Bei einer *ex-vivo* Expansion von LESC auf einer Trägermatrix,

wie der häufig genutzten AM, fehlt die Stammzellnische der LESC. Dadurch unterliegen die Zellen nicht mehr ihrer natürlichen physiologischen Regulation und verändern ihren Phänotypen während der *ex-vivo* Kultivierungsphase [77]. Es kommt vermehrt zu dem Verlust der Stammzeleigenschaften und zu einer finalen Differenzierung der Epithelzellen, was ein Versagen der regenerativen Zellfunktion nach sich zieht [54]. Ebenso besteht ein Abstoßungsrisiko durch das immunologische Potential der körperfremden Zellen und Gewebe. Aus diesem Grund ist nach einer allogenen Limbusstammzelltransplantation eine lebenslange Immunsuppression notwendig [2]. Dies kann Niere und Leber schaden sowie die Hämatopoese beeinflussen [8, 77-79].

Die Therapie durch eine allogene Limbustransplantation bietet im Bestfall nur eine vorübergehende Regeneration der Kornea. Ein immunologischer Vorteil durch die Avaskularität der Kornea bei einer Keratoplastik entfällt bei einer Limbustransplantation durch die Vaskularität der Konjunktiva und des Gewebes unterhalb des Limbus. Dies beherbergt ein hohes immunologisches Potential, da der Spenderlimbus dadurch Anschluss an das Gefäßsystem des Empfängers bekommt. Sich im Transplantat befindende Immunzellen des Spenders, wie beispielsweise Langerhans Zellen, führen dann zu der häufigsten Ursache des Therapieversagens - der Transplantatabstoßung [2, 5]. Die durchschnittliche Überlebenszeit des Transplantats beträgt zwischen 3,2 und 3,9 Jahren. Ein Eintrüben der Kornea oder der Verlust der regenerativen Fähigkeit des Epithels wurde anschließend beobachtet [80].

1.5 Verwendung von dezellularisiertem Gewebe zur Gewebezüchtung

Das so genannte „*Tissue Engineering*“ dient der Bildung eines Gewebekonstrukts *in vitro*, welches anschließend *in vivo* verwendet werden kann. Vor allem durch die steigenden Populationszahlen und den wachsenden Bedarf an Spenderorganen rückt die Nutzung von *ex-vivo* generierten, künstlichen Geweben immer häufiger in den Fokus der Forschung und wird aktuell bereits für die Reparatur oder den Ersatz einiger Organe klinisch genutzt [81]. Dabei ist Haut das erste Gewebe, das künstlich durch *Tissue Engineering* hergestellt werden konnte. Zum einen, weil Hautproben schnell und kostengünstig verfügbar sind, zum anderen ist sie zellulär einfach strukturiert [82]. Aber auch bei komplexeren Organen zeigen sich Fortschritte. So wurden bereits künstlich hergestellte autologe Blasenersatzes mit gutem Ergebnis transplantiert [83].

Ein Teilgebiet des *Tissue Engineerings* befasst sich mit der Nutzung von dezellularisiertem Gewebe. Dezellularisierung bedeutet die Entfernung aller Zellen eines Gewebes unter Erhalt der Grundstruktur und der Extrazellulärmatrix (EZM). Ziel ist es, dieses dezellularisierte Gewebe *in vitro* mit den entsprechenden Zellen zu re-besiedeln, um es anschließend *in vivo* zu transplantieren [84]. Dezellularisiertes Gewebe wurde schon für die Rekonstruktion zahlreicher Organe erfolgreich *in vitro* als Grundlage der Gewebezüchtung verwendet, wie beispielsweise des Urinaltrakts, der Leber oder von Gefäßen [85-88]. Die Verwendung von dezellularisiertem Gewebe bietet dabei verschiedene Vorteile: (1) Da von den zellulären Komponenten die größte Antigenquelle ausgeht, besitzt es durch die Entfernung aller nativen Zellen und DNA nur ein minimales immunologisches Potential, [89]. (2) Trotz Entfernung der Zellen bleibt die native Grundstruktur samt EZM erhalten, beim Limbus beispielweise die Krypten [81]. Dadurch wird eine nahezu perfekte Wachstumsgrundlage für die körpereigenen Zellen geschaffen, welche die Proliferation und Differenzierung von gewebespezifischen Zellen fördert. Durch die Bindung von Zellen an die EZM über Integrine können intrazelluläre Signalwege aktiviert werden und die Sekretion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren induziert werden [74, 84, 90]. Die EZM stellt einen bioaktiven Träger dar, welcher bisher von keinem künstlich hergestelltem Gerüst vergleichbar in seiner Funktion nachgeahmt werden konnte [91]. Durch den Strukturerhalt der Matrix durch die EZM ist sie außerdem operativ gut handhabbar [84]. (3) Ein weiterer großer Vorteil von dezellularisiertem Gewebe ist das bestehende drei-dimensionale (3D) Gerüst, welches den Zellen geboten wird. In einem 3D-Gerüst werden die Zelladhäsions-Moleküle speziell angeordnet. Diese Anordnung bedingt die mechanischen Eigenschaften der Matrix und somit den Phänotypen, die Zellidentität und das Differenzierungsverhalten der Zellen. Die Form der Zellen und des Gewebes unterscheiden sich somit in einem zwei-dimensionalen (2D)-Gerüst von einem 3D-Gerüst. Ein Wachstum von Zellen in 2D-Umgebung kann zu Bildung von Artefakten und zu einer Veränderung der zelleigenen Signalwege führen, welche unter anderem durch die Form des Gewebes vorgegeben werden [92-94].

Dezellularisiertes Gewebe kann entweder als zellfreies Gerüst genutzt werden, wie beispielsweise dezellularisierte aortale Homografts [95, 96], oder als vollständiger Gewebeersatz. Um diesen zu generieren, muss das dezellularisierte Gewebe mit neuen Zellen re-epithelialisiert werden. Dafür werden bevorzugt die Stammzellen des Ursprungsorgans als Quelle ausgewählt, welche autologen, allogenen oder xenogenen Ursprungs sein können.

Ist das Verwenden der zum Organ gehörenden Zellen nicht möglich, können Stammzellen anderen Ursprungs genommen werden.

1.6 Porcines Gewebe als Matrix

Bei der Nutzung von humanem Material gibt es einige Nachteile: Bis heute besteht eine geringere Verfügbarkeit von humanem Spendermaterial im Vergleich zu porcinem Material. Gleichzeitig ist die Transplantation von humanem Material durch notwendige vorherige Testungen, wie des Infektionsstatus, sehr kostenintensiv. Weiterführend verschlechtert sich die Qualität des Limbus mit dem Alter. Zheng et al. fanden heraus, dass bei zunehmendem Alter die Ausprägung der Vogt-Palisaden in der Hornhaut abnimmt. So konnten in der Gruppe der über 60-Jährigen nur in 40% der Untersuchungen mittels konfokaler *in vivo* Mikroskopie Vogt-Palisaden gefunden werden [97]. Während das durchschnittliche Alter von Augenhornhautspendern bei 75 Jahren liegt [98], werden Schweinen im Alter von ungefähr sechs Monaten geschlachtet [99]. Dadurch werden bei der Nutzung von porcinem Material deutlich jüngere und qualitativ hochwertigere Gewebe verwendet.

Das Hausschwein (*Sus scrofa domesticus*) ist in Bezug auf Anatomie, Physiologie und Größenverhältnisse der Organe vergleichbar mit dem Menschen [100]. Auch führt die hohe Identität des porcinen und humanen Genoms zu einer bevorzugten Verwendung von porcinem Material zu Forschungszwecken [101]. 90% der Basispaarketten der DNS stimmen zwischen Mensch und Schwein überein, dies zeigt eine enge Verwandtschaft der beiden Säugetiere [102]. In Deutschland wurden im Jahr 2019 etwa 55 Millionen Schweine geschlachtet [103], wobei die Augen ungenutzt als Schlachtabfälle entsorgt werden. Statt diese zu verwerfen, könnten sie zur einfachen, schnell verfügbaren und günstigen Ressource für den Gewinn von Korneae genutzt werden. Zeng et al. verglichen die porcine mit der humanen Kornea und stellten fest, dass diese sich in Bezug auf ihre biomechanischen Eigenschaften ähneln. Auch in Größe und Dicke der Kornea sind beide Spezies vergleichbar [104], wobei die porcine Kornea etwas größer und dicker ist (Größe: human: 12 x 11 mm; porcine: 15 x 12 mm; Dicke: human: 560 µm; porcine: 690 µm) [105]. Der porcine Limbus gilt unter den Tieren als der Einzige, der vergleichbar mit dem humanen Limbus Vogt-Palisaden aufweist [31, 106]. Diese sind im Gegensatz zum menschlichen Limbus nicht vermehrt auf dem superioren und inferioren Teil zu finden, sondern verteilen sich um das gesamte Auge. Während das Volumen und die Form der Palisaden abhängig von der Lokalisation im Limbus beim Menschen stark und individuell variieren, ist beim porcinen Auge kein Unterschied festzustellen [106]. Fehlende Augenbrauen, die andere Position

der Augen im Gesicht und die zum Menschen hin abweichende Lidform bedingen einen anderen UV-Strahlen-Einfluss und somit auch eine andere Ausprägung der Vogt-Palissaden [106]. Zusätzlich kann dezellularisiertes Gewebe mittels Gammastrahlung sterilisiert werden, wodurch potentielle Pathogene auf der porcinen Kornea entfernt werden und eine Übertragung dieser sehr unwahrscheinlich wird. Porcines Material kommt bereits vielfältig im Patienten zum Einsatz, so werden beispielsweise künstliche Herzklappen vom Schwein verwendet. Als aktuelle Forschungsdurchbrüche wurden erstmals ein Schweineherz und eine Schweineniere von genmodifizierten Schweinen in Menschen transplantiert [107, 108]. Trotz Notwendigkeit verschiedener Tests des porcinen Materials vor einer Verwendung *in vivo*, stellt der porcine Limbus eine potentiell preisgünstigere Alternative zum humanen Limbus mit hoher Biokompatibilität und Verfügbarkeit dar.

1.7 Grundlage der Arbeit

Das Etablieren einer alternativen Matrix für Limbustransplantationen ist von großem klinischem Interesse. Diese Matrix sollte der physiologischen Struktur der Stammzellnische entsprechen, den Erhalt des Phänotyps der LESC fördern, biokompatibel sein, eine geringe bis keine Immunogenität aufweisen, GMP-konform herstellbar sein und dabei in ausreichender Menge und kostengünstig verfügbar sein.

In Vorarbeiten von Spaniol et al. wurde initial der Erhalt der Struktur des humanen Limbus nach Dezellularisierung untersucht [77]. Neben der Etablierung des geeigneten Dezellularisierungsprotokolls auf Basis der Messung der Rest-DNA und Zellfragmenten, wurde die Gewebeintegrität mittels Transmissionselektronen- und Rasterelektronenmikroskopie, Zelllebensfähigkeitstests sowie immunhistochemischer Färbungen untersucht. Das Zellüberleben, die Proliferation und Differenzierung sowie die Epithelbildung sind abhängig von der Integrität der Stammzellnische. Diese besteht aus dem Konstrukt der lokalen Umgebung, der Nachbarzellen und des unter dem Limbus liegenden Stromas. Der Nachweis des Erhaltens der Nischenstruktur nach Dezellularisierung stellte den ersten Schritt für eine mögliche Nutzung des dezellularisierten Limbus als Matrix zur *ex-vivo* Expansion von LESC dar.

Die derzeitigen Trägermatrices können die Anforderungen für eine erfolgreiche *ex-vivo* Expansion von LESC nicht im ausreichenden Maße erfüllen, da die spezifische Nische der LESC nicht ausreichend simuliert werden kann. Die Bedeutung der Stammzellnische für die LESC wird deutlich, wenn der Erfolg von limbalen Rekonstruktionen mittels *ex-vivo*

kultivierter LESC betrachtet wird. Befinden sich diese während der *ex-vivo* Kultivierungsphase nicht in der Nähe ihrer ursprünglichen Nische, verändern sie ihren Phänotypen und differenzieren aus [54]. Folgend verlieren die Zellen ihre regenerativen Fähigkeiten und es kommt zu einem Transplantatversagen. Ein Verweilen der Stammzellen in ihrem undifferenzierten Stadium ist deshalb essentiell für einen langfristigen Therapieerfolg [77].

Der dezellularisierte Limbus als mögliche Transplantationsmatrix bietet dahingegen viele Vorteile. Nach jeder perforierenden oder lamellären Keratoplastik verbleibt ein ungenutzter korneoskleraler Ring, der derzeit entsorgt wird. Dieser eignet sich hervorragend für eine limbale Dezellularisierung. Somit könnten eine Vielzahl von Spenderkorneae effektiver durch die doppelte Verwendung genutzt werden [77]. Ebenso werden viele humane Spenderkorneae verworfen, die nicht den Standards entsprechen. Eine schlechte Gewebequalität, eine positive Serologie, übertragbare Krankheiten oder Autopsieergebnisse stellen hierbei die Hauptgründe für einen Ausschluss dar [109]. Bei der häufig durchgeführten *Descemet Membrane Endothelial Keratoplasty* (DMEK) ist ein Hauptkriterium zur Verwendung der Hornhaut die Endothelzellzahl; ist diese zu gering, wird die Hornhaut verworfen. Diese könnte stattdessen zur Dezellularisierung verwendet werden. Durch die Dezellularisierung wird das Risiko einer immunologischen Reaktion minimiert. Patienten, bei denen eine Transplantation in einem nicht-entzündungsfreien Auge stattfindet, profitieren von einer nicht-immunogenen Matrix, durch die das Risiko einer Transplantatabstoßung minimiert wird [74]. Die Autoren Spaniol et al. fanden heraus, dass ein dezellularisierter humaner Limbus keine Zytotoxizität besitzt. Trotz Dezellularisierung bleibt die Struktur der Matrix erhalten, sodass eine gute operative Handhabbarkeit gegeben ist [84]. Somit kann der re-epithelialisierte, dezellularisierte Limbus direkt als Transplantat genutzt werden, wodurch keine Übertragung der Zellen auf eine andere Trägermatrix notwendig wird. Ebenfalls bewiesen sie, dass nach der Dezellularisierung die Struktur des Limbus mit seinen Krypten und der spezifischen EZM und Basalmembran erhalten bleiben [77]. Dadurch bietet der dezellularisierte Limbus als einzige Trägermatrix alle Eigenschaften der natürlichen Stammzellnische, welche die LESC zum Anwachsen, Proliferieren und Überleben benötigen. Durch den Erhalt der spezifischen Struktur des Limbus, kann den allogenen LESC eine Trägermatrix geboten werden, auf der sie auf natürliche Weise reguliert werden könne. Dies kann zu einem besseren Langzeiterhalt des Phänotyps der Stammzellen beitragen. In der Folge würden kein *Feederlayer* zur *ex-vivo* Kultivierung der LESC mehr benötigt und somit die Gefahr einer Kontamination mit Fremd-DNA sowie das immunologische Potential reduziert werden.

1.8 Anforderungen an eine Trägermatrix für LESC

Aus dem aktuellen Forschungsstand ergibt sich, dass es von hoher klinischer Relevanz ist, neue Trägermatrices für die *in vitro* Kultivierung sowie der *in vivo* Transplantation von LESC zu finden, welche

- zur Minimierung des Abstoßungspotentials kein oder nur ein geringes immunologisches Potential beherbergen,
- die Eigenschaften der Stammzellnische und ihrer Umgebung aufweisen und damit die Eigenschaften der LESC sowie deren Phänotypen erhalten,
- sich für eine Expansion von LESC eignen, ohne dabei auf einen *Feederlayer* angewiesen zu sein,
- eine hohe Biokompatibilität aufweisen und
- eine große Verfügbarkeit haben.

1.9 Ziel und Thesen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung der nahezu erhaltenen Originalnische im dezellularisierten humanen und porcinen Limbus auf das Verhalten von LESC untereinander und mit in 2D-Zellkulturschalen gewachsenen Kontrollgruppen verglichen. Dies hat zum Ziel, den dezellularisierten Limbus als Wachstumsunterlage für LESC mit potentiell besserem Langzeiterhalt der Stammzellen und als Transplantat bei einer LSCD hinsichtlich einer späteren klinischen Nutzung zu untersuchen.

Folgende Ziele dieser Arbeit werden im Hinblick auf den Erhalt der Progenitorzeleigenschaften, des Zellüberlebens und der Proliferation untersucht: Es soll nachgewiesen werden, dass LESC

1. auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus anwachsen,
2. auf dezellularisiertem Limbus ihre Stammzeleigenschaften erhalten und ein vergleichbares oder höheres Proliferationsverhalten als auf einer 2D-Zellkulturschale aufweisen,
3. vergleichbar auf dem dezellularisierten humanen und porcinen Limbus wachsen,
4. kultiviert auf dem Limbus an der Luft-Flüssigkeits-Grenze zu einer Mehrschichtigkeit des neuen Epithels unter Erhalt der Stammzeleigenschaften der LESC führen kann.

Um diese Ziele zu erreichen, werden vier Thesen aufgestellt und überprüft (Tabelle 1).

Tabelle 1: Thesen der Arbeit

These 1 Eine *ex-vivo* Kultivierung von LESC, der Erhalt deren Stammzeleigenschaften sowie des Proliferationsverhaltens ist auf dezellularisiertem humanen oder porcinen Limbus möglich.

These 2 Der dezellularisierte humane und porcine Limbus unterscheiden sich nicht in der Expansion von *ex-vivo* kultivierten LESC, dem Erhalt deren Stammzeleigenschaften sowie des Proliferationsverhaltens.

These 3 Der dezellularisierte humane und porcine Limbus erhalten die Stammzeleigenschaften und das Proliferationsverhalten von *ex-vivo* kultivierten LESC besser als eine 2D-Zellkulturschale.

These 4 Eine Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze begünstigt die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels nach Aussaat von LESC auf einer dezellularisierten Kornea und bewirkt einen Unterschied in der Erhaltung der Stammzeleigenschaften.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Genutzte Geräte und Verbrauchsmaterialien werden im Anhang aufgeführt (Anhang, Kap. 6.1 und Kap. 6.2).

2.1.1 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Mowiol 4-88 (81381)	Aldrich Chemicals (Missouri, United States)
Fetales Bovines Serum Superior (S0615)	Biochrom GmbH (Berlin, Germany)
DEMI-Wasser, entionisiert (20170)	Fischar (Saarbrücken, Germany)
Ethanol absolut (27694)	
Antibiotic-Antimycotic (100x) (15240062)	Gibco (Kalifornien, United States)
Sodium Bicarbonate Solution 7,5% (25080094)	
Epidermal Growth Factor (E3478)	
Nuklease freies Wasser AM9937 (10526945)	Invitrogen (Kalifornien, United States)
SuperScript II Reverse Transkriptase (10328062)	
Citronensäure (7624.1)	
Desoxycholsäure Natriumsalz (3484.3)	
Eosin-G-Lösung 0,5% wässrig (X883.2)	
Hämalaumlösung sauer nach Mayer (T865.3)	
Kaliumchlorid (6781.3)	Roth (Karlsruhe, Germany)
Kaliumdihydrogenphosphat (3904.2)	
Natriumchlorid (3957.2)	
Paraplast PLUS für die Histologie (X881.1)	
Roti Histo-Kit II (T160.2)	

Roti-Histofix 4% (P087.1)

Salzsäure 32% (X896.1)

Schiffs Reagenz für die Mikroskopie
(X900.1)

Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (3580.3)

Triton x 100 (3051.2)

Tween 20 (9127.2)

2-Mercaptoethanol (M3148)

Adenine (A2786)

Choleratoxin powder from Vibrio Cholera
(C8052)

DAPI for nucleic acid staining (D9542)

Donkey Serum USDA APHIS (D9663)

StableCell™ Dulbecco's Modified Eagle's
Medium high Glucose (D0819)

Dulbecco's Modified Eagle's Medium /
Nutrient Mixture F-12 Ham (D8062)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(D8537)

Glycerol for molecular biology (G5516)

Sigma Aldrich (Missouri, United States)

Hydrocortisone powder (H0888)

Lysis Solution for total RNA Kit
(4305895)

Mitomycin C from Streptomyces caespitosus
(M0503)

Penicillin-Streptomycin (P4333)

RNase away (10666421)

T3 Powder für T/T (T6397)

Transferrin powder for T/T (T8158)

Trizma hydrochloride (Tris-HCl) (T1503)

Trypanblau 0,4% (T10282)

Material und Methoden

Trypsin-Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Solution, 0,5 g porcines Trypsin und 0,2 g EDTA (1x, T3924) / 5 g porcines Trypsin und 2 g EDTA (10x, T4174)

di-Sodium hydrogen phosphate dihydrate (1.19753.0250)

VWR International (Pennsylvania, United States)

Xylol (10293EP)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die Chemikalien wurden den Erfordernissen entsprechend in deionisiertem (dH_2O) oder in destilliertem Wasser (Aqua dest.) gelöst. Je nach Bedarf wurden die Lösungen bei 4°C ¹ oder bei Zimmertemperatur² aufbewahrt.

10 x Phosphate Buffered Saline (PBS) (pH 7,4)²

200 g NaCl
5 g KCl
36 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
6 g KH_2PO_4
Auf 2,5 l: Aqua dest.

1 x PBS (pH 7,4)²

100 ml 10x PBS
900 ml Aqua dest.

Natriumcitrate Puffer (10mM)¹

29,41 g Natriumcitrat
19,21g Zitronensäure

Mowiol¹

12 g Mowiol
30 g Glycerin
30 ml Aqua dest.
0,2 M Tris-HCl-Puffer

Tris-HCl-Puffer (pH 8,5)²

3,15 g Tris-HCl
96,85 ml Aqua dest.

2.1.3 Kits

Feulgen Kit Natriumdisulfit-Konzentrat	Merck (Darmstadt, Germany)
GenElute Mammalian Total RNA Mini-prep Kit	Sigma Aldrich (Missouri, United States)
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, United States)

2.1.4 Enzyme

Cell Proliferation Reagent Water soluble tetrazolium (WST)-1 (11644807001)	Roche (Basel, Swiss)
DNase I (4716728001)	
Insulin solution human (I9278)	Sigma Aldrich (Missouri, United States)
Power SYBR Green PCR Master Mix (4367659)	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, United States)
Dispase (734-1212)	VWR International (Pennsylvania, United States)

2.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma eurofins (Luxemburg) synthetisiert. Für einen PCR-Zyklus wurde ein 20 µl Volumen mit je 0,2 µl Primer pro Ansatz verwendet, was 0,1 pmol/µl Oligonukleotid entspricht.

hABCG2-F	TGCAACATGTACTGGCGA
hABCG2-R	TCTTCCACAAGCCCCAG
hCK15-F	GGAGGTGGAAGCCGAAGTAT
hCK15-R	GAGAGGAGACCACCATCGCC
hBax-F106	GGGTTGTCGCCCTTTTCTAC
hBax-R213	GGAGGAAGTCCAATGTCCAG
hBcl2-F97	CTGAGTACCTGAACCGGCA
hBcl2-R202	GAGAAATCAAACAGAGGCCG

Material und Methoden

hp63 α Np-F	CTGGAAAACAATGCCCAGAC
hp63 α Np-R	TGGAGAGAGAGCATCGAAGG
hp63 α -F	AGGGGCTGACCACCATCTAT
hp63 α -R	GTCTCACTGGAGCCCACACT
hGAPDH-F524	TGCACCACCAACTGCTTAGC
hGAPDH-R598	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

2.1.6 Antikörper

Anti-Caspase 3 antibody (Rabbit), ab4051

Anti-Cytokeratin 3 antibody (Mouse), ab77869

Anti-Cytokeratin 12 antibody (Rabbit), ab185627

Anti-Cytokeratin 15 antibody (Rabbit), ab52816

Anti-Ki67 antibody (Rabbit), ab16667

Anti-p63 α antibody (Mouse), ab735

Abcam (Cambridge, Great Britain)

Anti-BCRP (ABCG2) antibody (Mouse), MAB4146

Merck Millipore (Massachusetts, United States)

Anti-Maus IgG, Alexa Fluor 488 (Donkey)

Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 488 (Donkey)

Jackson Immuno-Research (Pennsylvania, United States)

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie (Referenz)	Beschreibung	Kultur
ATCC [®] CCL-92 [™]	3T3-Swiss Albino, murine Fibroblasten	Dulbecco's Modified Eagle's Medium high Glucose + 10% Fetales Bovines Serum (FBS) + 1% Penicillin / Streptomycin (P/S)

2.1.8 Software

Zur Auswertung der histologischen Färbungen wurde die Software Leica Application Suite, Version 4.6.1 (Leica, Wetzlar, Germany) zur Erstellung der Fotos verwendet. Für die statistische Auswertung wurde SPSS 26 (IBM, Ehningen, Germany) verwendet.

2.2 Methoden

Ein positives Ethikvotum der örtlichen Ethikkommission (Nummer 4139, sowie eine Ergänzung mit der Nummer 4722; genehmigt durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät Düsseldorf) liegt vor. Die Arbeit wurde nach den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden pro Beobachtungszeitpunkt und Kultivierungsart je drei humane und drei porcine dezellularisierte Korneae inklusive Limbusregion mit humanen limbalen epithelialen Stammzellen re-epithelialisiert. Dabei wurden pro Beobachtungszeitpunkt mindestens drei, bestenfalls sechs unterschiedliche humane Stammzellspender verwendet. Die re-epithelialisierten Korneae wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Übersichtsfärbungen (HE-Färbungen), Immunfluoreszenz, quantitativer Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*real-time quantitative polymerase chain reaction*, qrt-PCR) und Zellproliferationsassay untersucht.

Die humanen Korneae wurden von der Lions Hornhautbank Nordrhein-Westfalen (Augenklinik, Universitätsklinikum Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität, Deutschland) und die porcinen Korneae von dem Schlachthof Stautenhof (Darderhöfe 1, 47877 Willich, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die Methodik teilt sich in die drei Untergruppen *Zellkultur*, *Histologische Aufarbeitung* und *Molekularbiologische Aufarbeitung* auf. Das folgende Schema gibt eine Übersicht über die durchgeführten Experimente (Abb. 5).

Projektablauf

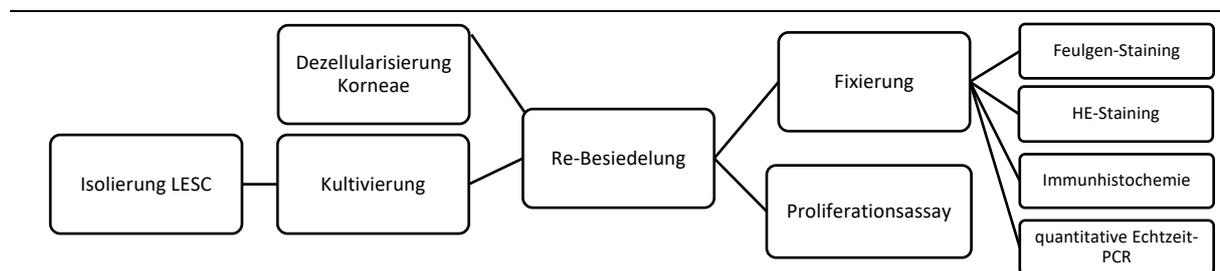


Abb. 5: LESC = Limbale epitheliale Stammzellen, HE = Hämatoxylin-Eosin, PCR = Polymerasekettenreaktion

2.2.1 Gewebegewinnung

Die humanen Korneae wurden als korneosklerale Ringe aus der Lions Hornhautbank entnommen. Die Lagerungsdauer der Korneae betrug wegen der notwendigen Durchführung

serologischer Tests vor der Verwendung einige Tage bis Wochen und variierte zwischen den Korneae.

Die porcinen Korneae wurden aus dem Bulbus präpariert. Dabei betrug die Lagerungszeit der Schweineaugen bis zur Präparation maximal zwei Stunden (h). Das Schweineauge wurde durch einen äquatorialen Schnitt in der Sklera eröffnet und die Sklera mittels scharfer Schere mit einem Abstand von 5 mm zum Limbus entfernt. Ein Entfernen des Glaskörpers, der Linse und des Ziliarkörpers erfolgte mit einer chirurgischen Pinzette. Die Korneae wurden in eine 6-Well-Platte mit PBS (+2% P/S) überführt und über Nacht auf einen Kreisschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Dezellularisierung.

2.2.1.1 Dezellularisierung der humanen und porcinen Kornea

Insgesamt wurden 32 humane und 52 porcine Korneae dezellularisiert. Das Dezellularisierungsprotokoll der Korneae wurde nach Spaniol et al. genutzt [77] und für die humanen und porcinen Korneae analog angewendet:

Nach der Entnahme der Korneae erfolgte eine Inkubation dieser für 24 h in 3 ml PBS + 2% P/S bei 4°C in einer 6-Well-Platte auf einem Kreisschüttler mit anschließender dreimaliger Waschung mit PBS + 2% P/S. Die anschließende Inkubation für 48 h bei 4°C auf einem Kreisschüttler in 2%-igem Natriumdesoxycholat diente dem Zellaufschluss und der Solubilisierung von Membranproteinen. Dabei wurden die Korneae täglich dreimal mit PBS + 2% P/S gewaschen. Mittels DNase-Lösung (167 U/ml) wurde die DNA über Nacht bei 4°C auf einem Kreisschüttler hydrolysiert. Als letzter Schritt fand eine erneute dreimalige Waschung mit PBS + 2% P/S sowie ein Entquellen der Korneae mit PBS + 2% P/S und Glycerol (Verhältnis 1:1) über Nacht bei 4°C auf einem Kreisschüttler statt. Anschließend wurden die dezellularisierten Korneae dreimal mit PBS gewaschen und in PBS + 2% P/S bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Zellkultur

Aus humanen korneoskleralen Ringen wurden LESC gewonnen. Diese wurden kultiviert und auf den dezellularisierten humanen und porcinen Korneae ausgesät, welche anschließend für 3, 7 oder 21 Tage kultiviert wurden. Dann erfolgte die histologische Aufarbeitung der Korneae oder die Durchführung eines Zellproliferationsassays.

2.2.2.1 Feederlayer

Um eine Differenzierung der LESC während der *in vitro* Kultivierung zu vermeiden, wurde ein sogenannter *Feederlayer*, bestehend aus murinen, proliferationsinhibierten 3T3-Fibroblasten genutzt. Eine Behandlung der 3T3-Fibroblasten mit dem Zytostatikum Mitomycin C verhindert eine Wachstumsdominanz der 3T3-Fibroblasten, da dieses die Zellteilung und damit das Wachstum inhibiert. Die murinen 3T3-Fibroblasten wurden in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose (DMEM) versetzt mit 10% FBS und 1% P/S kultiviert (folgend: DMEM-Vollmedium).

Eine Passagierung der 3T3-Fibroblasten erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die 80%-konfluent gewachsenen Zellen wurden mit vorgewärmter PBS gewaschen und anschließend durch eine fünfminütige Inkubation mit 1 x Trypsin-EDTA bei 37°C und 5% CO₂ abgelöst. Die Zellen wurden in 5 ml DMEM-Vollmedium re-suspendiert. Die anschließende Aussaat in einer 1:10 Verdünnung erfolgte in einer sterilen Zellkulturflasche. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in luftfeuchter Atmosphäre kultiviert.

Zur Wachstumsinhibition der 3T3-Fibroblasten wurden die konfluent gewachsenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit Mitomycin C in einer Konzentration von 2 µl/ml für 2 h im Brutschrank inkubiert. Nach dreimaligem Spülen der Zellen mit je 10 ml PBS wurden die wachstumsinhibierten 3T3-Fibroblasten durch eine Inkubation für 5 Minuten (min) mit 1 x Trypsin-EDTA bei 37°C und 5% CO₂ von der Kulturflasche abgelöst, in ein Falkontube überführt und anschließend bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert und in DMEM-Vollmedium re-suspendiert, wobei das enthaltene FBS das Trypsin inaktivierte. Die Zellen wurden in einer Gesamtzahl von $1,8 \times 10^6$ Zellen in eine T75-Kulturflasche gebracht und über Nacht adhären gelassen. Am Folgetag wurde das DMEM-Vollmedium durch EZM für die Nutzung als Feederlayer für die LESC ausgetauscht.

Die Neubauer-Zählkammer diente dabei der Bestimmung der Zellzahl. Dafür wurden die Zellen wie beschrieben aus der Zellkulturflasche abgelöst und zentrifugiert. Nach Re-Suspension des Zellpellets in DMEM-Vollmedium, wurden 10 µl Zellsuspension auf die Zählkammer übertragen. Mittels Auszählung am Mikroskop wurde durch die Zellzahl n in einem definierten Volumen die Zellkonzentration bestimmt (Konzentration = $n \times 10^4$ Zellen / ml Zellsuspension).

2.2.2.2 *Isolierung und Kultivierung von LESC*

Die Isolierung der LESC aus humanen korneoskleralen Ringen erfolgte von insgesamt 38 humanen Spendern. Die Kultivierung der epithelialen Stammzellen erfolgte in einem Epithelzellmedium, bestehend aus DMEM/Ham F12, versetzt mit 10% FBS, 10 µg/ml Adenin, 10 µg/ml Natrium-Bicarbonat, 10 µg/ml Antibiotika / Antimykotika, 10 µg/ml Transferrin, 0,5 µg/ml Insulin, 1 µg/ml Choleratoxin, 1 µg/ml Hydrocortison (folgend: EZM).

Zur Ablösung der LESC wurde der Ring über Nacht in 1,2 U/ml Dispase auf einem Kreischüttler bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde der Ring dreimal mit vorgewärmter PBS gewaschen und in einer Petrischale mit 1 ml EZM mit einem Skalpell in drei gleichgroße Stücke geteilt. Nach dreimaligem Waschen am Folgetag mit vorgewärmter PBS erfolgte die Teilung des Rings mit einem Skalpell in drei Stücke in einer mit 1 ml EZM bedeckten Petrischale. Mit der Epithelseite nach oben, wurde die Limbusregion wiederholt mit einem Skalpell (Nummer 21) ausgekratzt, um so die bereits durch die Dispase angelösten Zellen mechanisch abzulösen. Die so entstandene Zellsuspension wurde in eine T75-Zellkulturflasche mit dem 3T3-Feederlayer in EZM überführt. Ab dem dritten Kultivierungstag der LESC wurden dem EZM 10 µg/ml *Epithel Growth Factor* (EGF) hinzugefügt (folgend: EZM + EGF). Die Kultivierung der Zellen fand bei 37°C und 5% CO₂ in luftfeuchter Atmosphäre statt. Die Kultivierungsdauer betrug zwischen 14 und 30 Tagen, wobei ein Wechsel des EZM alle ein bis zwei Tage stattfand. Der Feederlayer wurde je nach Bedarf circa einmal die Woche mit 6 x 10⁵ Mitomycin-C-behandelten 3T3-Fibroblasten erneuert.

2.2.2.3 *Re-Besiedlung der dezellularisierten Korneae mit LESC*

Nach Erreichen einer Konfluenz der LESC von 60 bis 80% ohne Anzeichen epithelialer Differenzierung wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Die 3T3-Fibroblasten wurden mit 1 x Trypsin-EDTA bei 37°C und 5% CO₂ abgelöst und verworfen. Nach erneuter Waschung mit vorgewärmtem 1 x PBS, erfolgte die Ablösung der verbliebenen LESC durch eine Inkubation mit 10 x Trypsin-EDTA für 5 min im Inkubator. Anschließend erfolgte die Re-Suspension der abgelösten Zellen in 4 ml EZM + EGF, wobei das EZM zur Inaktivierung des Trypsins diente. Die Suspension wurde in ein Falkontube überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes und Re-Suspension in 2 ml EZM + EGF erfolgte die Auszählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer. Mit einem Skalpell erfolgte die Zerteilung der porcinen und humanen dezellularisierten Korneae in jeweils zwei Teile und durch eine Pinzette die Überführung in eine 12-Well-Platte. Anschließend wurden 1 x 10⁶ LESC pro Korneahälfte ausgesät. Die Zellzählung erfolgte

mittels Neubauer-Zählkammer (Kap. 2.2.2.1). Jedes Well wurde nach einer Anheftphase der Zellen von 10 min mit 1 ml EZM + EGF vorsichtig aufgefüllt.

2.2.2.4 Kultivierung der re-epithelialisierten dezellularisierten Korneae

Am ersten Tag nach der Re-Epithelialisierung wurden die Korneae in neue 12-Well-Platten überführt. Die Kultivierung erfolgte unter Standard-Kultivierungsbedingungen, sowie unter Kultivierung an einer Luft-Flüssigkeits-Grenze (*air liquid interface*, ALI). Bei der Standard-Kultivierung bedeckte 1 ml EZM + EGF die Korneae. Der Mediumwechsel erfolgte regelmäßig alle ein bis zwei Tage. Für das ALI wurden die re-epithelialisierten Korneae nur mit so viel EZM + EGF bedeckt, sodass sie bei der Kultivierung auf einem Kreisschüttler intermittierend mit Medium benetzt waren. Die Kultivierung erfolgte im Inkubator mit täglichem Mediumwechsel.

2.2.2.5 WST-1-Proliferationsassay

Der WST-Assay diente der Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Stammzellen nach Aussaat auf dezellularisiertem Gewebe. Um Verzerrungen durch mögliche Abweichungen in der ausgesäten Zellanzahl auszuschließen, wurde die erste Messung direkt nach dem Anwachsen der Zellen durchgeführt (4 h nach Aussaat, Tag (D) 0). Die anschließenden Messungen fanden an den Tagen 3, 7 oder 21 statt (D3, D7, D21). Pro Beobachtungszeitpunkt wurden drei re-besiedelte Korneae mit unterschiedlichen Stammzellspendern untersucht. Bei porcinen Korneae wurde eine Vollkornea, bei humanen Korneae ein korneoskleraler Ring wie in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben re-epithelialisiert. Als Vergleichsgruppe diente pro Beobachtungszeitpunkt die Aussaat von je 1×10^5 LESC des selben Spenders pro Well in einer 24-Multi-Well-Platte. Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer (Kap. 2.2.2.1).

Die Überführung der Korneae in eine neue 12-Well-Platte als ersten Schritt verhinderte eine Verfälschung des Ergebnisses durch an dem Boden der Wells angewachsene Zellen. Die Korneae sowie die Kontrollgruppe wurden 1 h mit dem WST-1-Reagenz (100 µl/ml in EZM Medium ohne EGF) inkubiert. Je 100 µl Medium wurden in ein 96-Well überführt. Je Probe wurden in je 6 - 16 Wells mittels Mikroplatten Reader die Absorption bei 450 nm gemessen. Als Referenzwert diente Medium (EZM + EGF) plus WST-1-Reagenz ohne Zellen.

Die LESC auf den Korneae und die auf Kunststoff ausgesäten LESC wurden mittels 1 x Trypsin-EDTA unter Inkubation für 5 min bei 37°C und 5 % CO₂ abgelöst, in EZM

aufgenommen und 5 min bei 1250 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands und einer Waschung mit PBS sowie einer erneuten Zentrifugierung bei 1250 rpm für 5 min, wurden die LESC trocken bei -80°C eingefroren und für die RNA-Isolierung aufbewahrt.

2.2.3 Histologische Aufarbeitung

Zielsetzung der histologischen Aufarbeitung ist die Beurteilung der durchgeführten Dezellularisierung und der Re-Epithelialisierung sowie die Untersuchung der Stammzeleigenschaften nach Aussaat auf dezellularisierter Kornea.

Die Fixierung der re-epithelialisierten Korneae erfolgte an ihrem Beobachtungszeitpunkt in 4%-igem Paraformaldehyd über Nacht. Anschließend wurden sie in einem Entwässerungsautomaten schrittweise entwässert (Tab. 2) und in Paraffin mit ihrer Schnittkante nach unten vertikal eingebettet. Die an einem Rotationsmikrotom angefertigten Schnitte von 4,5 µm Dicke wurden anschließend für 12 h bei 38°C zur besseren Haftung des Gewebes am Objektträger im Trockenschrank inkubiert.

Zu Beginn der histologischen und immunhistochemischen Färbungen fand eine Entparaffinierung in drei aufeinanderfolgenden Xylobädern für jeweils 5 min statt. Dies verhinderte eine Störung der Bindung der wasserlöslichen Farbstoffe durch das lipophile Paraffin. Eine darauffolgende absteigende Alkoholreihe (99%, 96%, 70%) mit einer Inkubationszeit von je 5 min diente der Re-Hydratisierung der Proben.

Tabelle 2: Programm für die Übernachtverarbeitung der re-epithelialisierten Korneae

Reagenz	Dauer (Stunden, Minuten)
Alkohol 70%	1,00
Alkohol 90%	1,00
Alkohol 100%	1,00
Alkohol 100%	2,00
Alkohol 100%	2,00
Xylol	1,00
Xylol	1,30
Xylol	1,30
Paraffin	2,00
Paraffin	3,00

Das aufgeführte Entwässerungsprogramm mit anschließender Wachseinbettung erfolgte am Concentrator 5301 von Eppendorf.

2.2.3.1 DNA-Nachweis nach Feulgen

Es wurden von jedem Zeitpunkt je zwei humane und zwei porcine Korneae für den DNA-Nachweis nach Feulgen ausgewählt, jeweils eine aus einer konventionellen Kultivierung und eine aus einer Kultivierung in ALI.

Es erfolgte die Entparaffinierung mit anschließender Re-Hydratisierung der Proben (Kap. 2.2.3). Hierauf folgte die Inkubation der Proben für 50 min in Salzsäure (5 mol/l), welche zu einer Abspaltung von Purin- und Pyrimidinbasen der DNA führte, wodurch diese hydrolysiert wurde und freie Aldehydgruppen entstanden. Die Proben wurden zweimal für 2 min in Aqua dest. gespült und anschließend für 60 min bei Raumtemperatur in fuchsin-schweflige Säure (Schiffs Reagenz) gegeben. Hierdurch entstand zusammen mit den freien Aldehydgruppen eine rotviolette Färbung der Zellkerne. Als nächster Schritt erfolgte die Behandlung der Proben zweimal für 3 min mit nach jedem Färbedurchgang erneuerter Natriumdisulfit-Spüllösung. Diese bestand aus 95 ml Aqua dest., 5 ml Natriumdisulfit-Lösung (540 ml Aqua dest., 30 ml 1 M HCl, 30 ml 10% Kaliumdisulfit-Lösung) und 1 ml 5 mol/l Salzsäure. Anschließend erfolgte eine Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 99%, Xylol) und das Eindecken der Schnitte mit Histokit. Die Auswertung der Proben unter dem Lichtmikroskop erfolgte 24 h nach Herstellung.

2.2.3.2 *Hämatoxylin und Eosin-Färbung*

Die histologische Beurteilung der re-epithelialisierten Korneae fand in einer HE-Färbung statt. Zum einen wurde die Erfolgsrate der Re-Epithelialisierungen ermittelt, zum anderen die Epithelstratifizierung beurteilt. Als erster Schritt erfolgten eine Entparaffinierung und Re-Hydratisierung (Kap. 2.2.3). Nach Spülung in Aqua dest. für 3 min, fand eine Inkubation der Schnitt für 5 min in Hämalaun statt. Durch das fließende Waschen der Schnitte unter Leitungswasser für 5 min wurde der pH auf mehr als drei erhöht und ein „Bläuen“ der Zellkerne trat ein. Nach der Gegenfärbung mit Eosin für 2 min folgte eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96%, 99%, 99%) sowie ein dreimaliges Waschen in Xylol für jeweils 5 min. Die Schnitte wurden im letzten Schritt mit Histokit eingedeckt.

2.2.3.3 *Auswertung der histologischen Färbungen*

Die zur weiteren histologischen Auswertung ausgewählten Schnitte entsprachen den folgenden Kriterien: (1) eine erfolgreiche Dezellularisierung der Kornea, (2) eine erfolgreiche Re-Epithelialisierung sowie (3) das Auffinden des Limbus. Um die Erfolgsrate der Re-Epithelialisierung zu quantifizieren, wurden die re-epithelialisierten Korneae unter dem Mikroskop beurteilt. Eine erfolgreiche Dezellularisierung sowie die Entstehung eines neuen Epithels dienten als Bewertungskriterien. Es sei darauf hingewiesen, dass nur zwei statt drei erfolgreicher Re-Epithelialisierungen für den Zeitpunkt D3 in ALI der porcinen Kornea gefunden wurden.

Um die Ausprägung der Mehrschichtigkeit abhängig von den Variablen Kultivierungsdauer (D3 / 7 / 21), Kultivierungsart (konventionell / ALI), Lokalisation (Limbus / zentrale Kornea) und Spezies (human / porcine) darstellen zu können, fand eine Auszählung der Epithelzellschichten an je vier Messpunkten pro Probe statt. Zwei Messpunkte lagen dabei im Bereich des Limbus, der erste in der ersten Krypte, der zweite am korneokonjunktivalen Übergang. Die anderen zwei Messpunkte gaben die Schichtanzahl der zentralen Kornea wieder, indem der erste Punkt ein Haupt Gesichtsfeld (*high-power field*, HPF) (400-fache Vergrößerung) von dem korneokonjunktivalen Übergang und der Zweite ein HPF (400-fache Vergrößerung) von dem Ende der Kornea entfernt lag.

2.2.3.4 *Immunhistochemische Färbung*

Für die Analyse der Stammzeleigenschaften der LESC nach Re-Epithelialisierung wurden fluoreszenzbasierte immunhistochemische Färbungen angefertigt. Die verwendeten Antikörper waren die Progenitorzellmarker ABCG2, p63 α und CK 15, die Marker für

differenzierte korneale Epithelzellen CK 3 und 12 (folgend: Epithelzellmarker), der Proliferationsmarker Ki67 und der Apoptosemarker Caspase 3. Diese wurden im folgenden Verhältnis verwendet:

Tabelle 3: Verwendete Antikörper in den Fluoreszenzfärbungen

Antikörper	Verhältnis
ABCG2	1:30
p63 α	1:50
Cytokeratin 15	1:50
Cytokeratin 3	1:30
Cytokeratin 12	1:30
Ki67	1:50
Caspase 3	1:100

Angabe der Verhältnisse der verwendeten Antikörper in PBS.

Im ersten Schritt erfolgte die Entparaffinierung in drei Xylolbädern mit anschließender Rehydratisierung in einer absteigenden Alkoholreihe (99%, 90%, 70%, 50%) für jeweils 5 min. Nach 3 min in Aqua dest. fand die hitzeinduzierte Epitop-Freilegung in einem 0,01 M Natriumcitrat-Puffer mit 0,25% Tween-20 für 35 min in einem Garkocher mit darauffolgender Abkühlung auf Eis für 30 min statt. Die Schnitte wurden dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen zur Vermeidung unspezifischer Färbung. Die Blockierung der Proben für die Färbungen mit anti-CK 15, anti-Caspase 3 und anti-Ki67 fand 60 min mit 5% Donkey Serum (DKS) angesetzt in PBS statt. Für die Färbungen mit anti-p63 α und anti-CK 12 wurde mittels 5% DKS + 0,3% Triton x 100 in PBS für 30 min geblockt. Die Proben für die Färbung mit anti-CK 3 wurden 30 min mit 5% FBS + 0,3% Triton X-100 angesetzt in PBS und die Proben für die Färbung mit anti-ABCG2 für 45 min mit 5% FBS + 0,25% Triton x 100 angesetzt in PBS geblockt. Das Triton X-100 diente hierbei der Permeabilisierung der Zellmembran, um das Eindringen der Antikörper in die Zelle zu erleichtern. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min erfolgte die Inkubation der Schnitte mit dem Antikörper in PBS + 2% DKS über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden dreimal für je 5 min in PBS gewaschen, danach erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (Alexa 488, Jackson) für 60 min. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden die Schnitte mittels Mowiol plus 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (4 μ l / 2 ml) eingedeckt und bei 4°C abgedunkelt gelagert. Die Auswertung erfolgte innerhalb einer Woche.

2.2.3.5 Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemisch gefärbte LESC wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung gezählt. Es wurde zwischen Zellen, die auf dem Limbus, und Zellen, die auf der zentralen Kornea angewachsen waren, differenziert. Diese Differenzierung ermöglichte den Rückschluss des Einflusses des Limbus auf die Eigenschaften der LESC. Die Abgrenzung des Limbus zur Kornea erfolgte anhand der anatomischen Struktur (Kap. 2.2.3.3). Zuerst wurde die Gesamtzellzahl pro HPF der mittels DAPI angefärbten Zellen bestimmt. Als nächster Schritt wurden die durch den jeweiligen Antikörper gefärbten Zellen ausgezählt. In ein Verhältnis zueinander gesetzt, konnte der prozentuale Anteil der Antikörper-positiven Zellen von Limbus und zentraler Kornea miteinander verglichen werden.

2.2.4 Molekularbiologische Aufarbeitung

Die Untersuchung der Stammzeleigenschaften nach einer Aussaat auf dezellularisiertem humanen oder porcinen kornealen Gewebe erfolgte zusätzlich mittels qrt-PCR. Dafür wurde die RNA aus den LESC isoliert, in komplementäre DNA (*complementary DNA*, *cDNA*) umgeschrieben und anschließend für eine qrt-PCR benutzt.

2.2.4.1 RNA-Isolierung

Das GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit von Sigma Aldrich diente der RNA-Isolierung. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Zentrifugiert wurde nach jedem Schritt für 15 Sekunden mit 16.000 rcf, falls nicht anders angegeben.

500 µl Lysis Solution, versetzt mit 2-Mercaptoethanol (10 µl / 100 ml), lysierte die Zellen, woraufhin sie in eine Filtrationssäule überführt wurden. Nach Zentrifugation erfolgte die Homogenisierung der Suspension mit gleicher Menge 70%igem Ethanol in Diethylpyrocarbonat-Wasser und die anschließende Überführung in die Bindungssäule sowie eine Zentrifugation. Als nächstes wurden die Proben jeweils mit 500 µl Wash Solution I und zweimal mit 500 µl Wash Solution II gewaschen mit zwischengeschalteten Zentrifugationsschritten. Nach Entfernung der Wash Solution und Trockenzentrifugation der Proben für 1 min, lösten 30 µl Elution Solution die RNA bei einer Zentrifugation bei 12.000 rcf für 1 min heraus. Der Überstand wurde erneut in die Bindungssäule gegeben und 5 µl Elution Solution hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 5 min erfolgte die Elution der RNA durch Zentrifugation der Proben für 1 min bei 12.000 rcf. Der RNA-Gehalt (in µg/µl) wurde photometrisch (Nano-Drop ONE, Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.4.2 Umschreibung mRNA in cDNA

Bei dieser Reaktion werden mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) DNA-Kopien (cDNA) der mRNA synthetisiert. Verwendet wurde das High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Thermo Fisher Scientific.

Die Reaktion setzt sich aus 14,20 µl RNA-Aqua dest.-Gemisch (je 0,5 µg RNA) und 5,8 µl Master Mix zusammen. Der Master Mix bestand aus 2 µl RT Puffer, 0,8 µl dNTPs, 2 µl RT Random Primers und 1 µl Reverse Transkriptase.

Beide Komponenten wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und in den Mastercycler (Eppendorf) gegeben. Das Programm des Cyclers war wie folgt:

- 10 min bei 25°C
- 120 min bei 37°C
- 5 min bei 85°C

Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qrt-PCR)

Mit der qrt-PCR kann die Akkumulation amplifizierter Produkte während des Reaktionsprozesses durch die Zugabe eines fluoreszierenden Moleküls (SYBR Green) detektiert werden. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und emittiert Licht der Wellenlänge 522 nm nach Anregung bei 498 nm. Dieses Fluoreszenzsignal verhält sich proportional zur Menge an vorhandener spezifisch amplifizierter DNA. Daraus ergibt sich, dass bei einer zunehmenden Signalstärke mehr PCR-Produkt vorhanden ist und damit eine größere Menge DNA amplifiziert wurde. Um die molekularen Eigenschaften der LESC nach Re-Epithelialisierung zu untersuchen, wurden folgende spezifische Primer genutzt: ABCG2, p63 α -1, p63 α -2, CK 15 (Progenitorzellmarker), Bax (pro-apoptotisch) und Bcl-2 (anti-apoptotisch).

Die Reaktion fand in einem Volumen von 10 µl statt. Der folgende Reaktionsansatz wurde jeweils pipettiert:

cDNA	1 µl
5'-Primer	0,2 µl
3'-Primer	0,2 µl
Power SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
Nukleasefreies Wasser	3,6 µl

Für die Kontrollen wurden 9 µl Master Mix plus 1 µl nukleasefreies Wasser pipettiert.

Bei 95°C für 5 min denaturierte die DNA zunächst. Anschließend erfolgten 40 Zyklen des nachstehenden Reaktionsschemas:

DNA-Denaturierung	95°C, 1 min
Primerannealing	60°C, 1 min
Elongation	72°C, 30 s bis 1 min

Die Aufnahme einer Schmelzkurve von 55 - 95°C mit einer Erhöhung von 0,5°C pro 30 s am Reaktionsende diente dem Ausschluss, dass mehr als ein Produkt amplifiziert wurde. Um eine gleiche Ausgangsmenge an cDNA in allen Proben zu gewährleisten, wurden alle Werte auf ein nicht reguliertes Referenzgen normiert, in der vorliegenden Arbeit das housekeeping-Gen GAPDH.

2.2.4.4 Auswertung der qrt-PCR

Die Auswertung erfolgte mittels delta delta CT Methode. Auf Zellkulturschalen ausgesäte LESC dienten als Kontrollgruppe, auf welche die Proben normiert wurden. Die Expressionen der sechs Zielgene als Zu- oder Abnahme relativ zu der Kontrolle war die Auswertungsgrundlage. Bei allen Proben wurden Duplikate analysiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte nach der Berechnungstabelle von Pfaffl (Pfaffl, 2001).

2.2.5 Statistische Analyse

Die Errechnung des Mittelwertes \pm Standardabweichung (SD) beschreibt die Streuung der Daten. Zur Untersuchung der Signifikanz zwischen unabhängigen Proben, wurden Zweistichproben-t-Tests durchgeführt. Multiple lineare Regressionen stellen die Einflüsse unabhängiger Variablen auf eine abhängige Variable dar. Das Signifikanzlevel betrug jederzeit $p \leq 0,05$.

2.2.5.1 Unabhängige Variablen

Spezies

Spezies beschreibt den Ursprung der dezellularisierten Kornea. Diese Variable ist deklariert mit 0 = human und 1 = porcine. In Versuchen mit der Kontrolle Kunststoff wurde diese als 2 definiert.

Kultivierungsdauer

Mit der Kultivierungsdauer werden die drei Untersuchungszeitpunkte der re-epithelialisierten Korneae beschrieben. Sie umfasst 1 = D3, 2 = D7 und 3 = D21.

Kultivierungsart

Die Variable Kultivierungsart umfasst die Kultivierung der re-epithelialisierten Korneae von dem Beginn der Re-Epithelialisierung bis zu ihrem Endzeitpunkt (siehe „Kultivierungsdauer“). Sie unterscheidet zwischen 0 = konventioneller Kultivierung und 1 = ALI.

Lokalisation

Diese Variable beschreibt die untersuchte Stelle der re-epithelialisierten Kornea. Sie hat die Ausprägung 0 = Limbus und 1 = Zentrale Kornea. Dabei wurden jene Zellen zum Limbus gezählt, die von dem sichtbaren Limbusanfang (erste Krypte) bis zum korneokonjunktivalen Übergang angewachsen waren.

2.2.5.2 Abhängige Variablen

Erfolg Re-Epithelialisierung

Diese Variable ist binär deklariert als „erfolgreich“ oder „nicht erfolgreich“. Mit LESC re-epithelialisierte Korneae wurden der Kategorie „erfolgreich“ zugeordnet, wenn sie die folgenden mittels HE-Färbung nachweisbaren Kriterien aufwiesen: (a) eine einwandfreie Dezellularisierung der Kornea hat stattgefunden und (b) es befinden sich Zellen im Limbus und auf der zentralen Kornea. Re-epithelialisierte Korneae, die diese Kriterien nicht erfüllten, wurden der Kategorie „nicht erfolgreich“ zugeteilt. Die Kriterien wurden mittels HE-Färbung bewertet (Kap. 2.2.3.2). Die Stichprobengröße beträgt 86. Mittels multipler linearer Regression wurde sie näher untersucht. Als unabhängige Variablen dienten Spezies und Kultivierungsart (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\text{Erfolg Re-Epithelialisierung} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart}$$

Epithelstratifizierung

Die Untersuchung der Anzahl der Epithelzellschichten dient der Visualisierung der Effekte der Variablen Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation auf die Ausprägung der Mehrschichtigkeit. Die Daten wurden mittels HE-Färbung ermittelt (Kap.

2.2.3.2). Sie ist metrisch skaliert, umfasst 140 Zählpunkte von 35 Proben und hat einen Mittelwert von 3,6 mit einem Minimum von 1 und einem Maximum von 28. Sie wurde mittels t-Tests und multipler Regression untersucht. Als unabhängige Variablen wurden bei der multiplen Regression Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation eingesetzt (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\text{Epithelstratifizierung} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart} \\ + \beta_3 \times \text{Kultivierungsdauer} + \beta_4 \times \text{Lokalisation}$$

Antikörper-positive Zellen

Die Variable Antikörper-positive Zellen wurde im Versuch „Immunhistochemische Färbung“ (Kap. 2.2.3.4) untersucht. Sie bildet sich aus dem prozentualen Anteil der mit dem spezifischen Antikörper angefärbten Zellen von der Gesamtzellzahl. Sie ist metrisch skaliert, umfasst insgesamt 490 Daten, aufgeteilt auf sieben Antikörper. Die Variable wurde mittels t-Tests und multipler Regression tiefergehend analysiert. Als unabhängige Variablen wurden Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation getestet (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\text{Antikörper-positive Zellen} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart} \\ + \beta_3 \times \text{Kultivierungsdauer} + \beta_4 \times \text{Lokalisation}$$

Lichtabsorption

Die Variable Lichtabsorption gibt das Ergebnis des WST-1-Proliferationsassays (Kap. 2.2.2.5) wieder. Die mittels Photometer gemessene Absorption verläuft proportional zur Verstoffwechslung der WST-1-Reagenz. Je mehr proliferierende Zellen sich im Assay befinden, desto höher ist die Verstoffwechslung und desto stärker die Lichtabsorption [110]. Sie ist metrisch skaliert und bezieht sich auf ein Datenset bestehend aus 36 Werten. Der Mittelwert beträgt 7,8, Minimum liegt bei 0,28, Maximum bei 27,77. Zur näheren Untersuchung wurden t-Tests durchgeführt, sowie eine multiple Regression mit den unabhängigen Variablen Kultivierungsdauer und Spezies, einschließlich der Ausprägung Kunststoff der Variable Spezies (Kap. 2.2.5.1). Das folgende Modell wurde angewendet:

$$\text{Lichtabsorption} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsdauer}$$

n-fold

Die Variable *n-fold* wird im Experiment qrt-PCR (Kap. 2.2.4.3) berechnet. Mittels der delta-delta CP Methode wurde der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung (Wachstum auf dezellularisiertem Gewebe) und der Kontrolle (Wachstum auf Kunststoff), normalisiert zu einem Referenzgen (GAPD-H), bezogen auf eine Standardprobe berechnet [111]. Dieser Expressionsunterschied wurde als *n*-fache Steigerung beziehungsweise als *n-fold* wiedergegeben. Die Variable basiert auf einem Datenset aus 108 Daten, aufgeteilt auf sechs Zielgene. Zur Veranschaulichung der Daten wurde eine Graphik (Kap. 3.4.2, Abb. 12) angefertigt.

C_T-Wert

Die Variable *C_T-Wert* wird im Experiment qrt-PCR (Kap. 2.2.4.3) ermittelt. Der Zyklus, in dem zum ersten Mal die Reporterfluoreszenz größer als der Schwellenwert ist, wird als *threshold cycle* oder *C_T* bezeichnet. Mit diesem können die cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Ein kleiner *C_T*-Wert ist interpretierbar als eine größere Menge der Ziel-cDNA in der Probe, da nur wenige Amplifikationszyklen nötig sind, um ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal zu generieren. Hingegen ein großer *C_T*-Wert bedeutet eine geringere Menge der Ziel-cDNA in der Probe. Das Datenset besteht aus 216 Daten. Die Daten wurden mittels t-Tests und multipler Regression weiterverarbeitet. Bei der Regression wurden als unabhängige Variablen Spezies und Kultivierungsdauer (Kap. 2.2.5.1) eingesetzt. Folgendes Modell wurde verwendet:

$$C_T\text{-Wert} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsdauer}$$

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte aufgezeigt werden, dass eine Expansion von *ex-vivo* kultivierten LESC auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus möglich ist. Die Trägermatri- ces ermöglichen den Erhalt der Stammzeleigenschaften sowie der Proliferationsfunktion (Verifizierung These 1). Es wurde nachgewiesen, dass ein Anwachsen von LESC auf de- zellularisiertem humanen Limbus erfolgsversprechender ist als auf einem dezellularisier- ten porcinen Limbus. Nach erfolgreicher Expansion unterscheiden sich beide Wachstums- untergründe nicht in Bezug auf Erhalt der Stammzell- und Proliferationsfunktion (Falsifi- zierung erste Aussage der These 2, Verifizierung zweite Aussage der These 2). Des Wei- teren zeigten sich keine Unterschiede in dem Erhalt der Stammzellfunktion und des Proliferationsverhaltens durch das dezellularisierte korneale Gewebe im Vergleich mit ei- ner 2D-Zellkulturschale (Falsifizierung These 3). Als letzter Punkt wurde nachgewiesen, dass die Kultivierungsart keinen Unterschied in der Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels oder in der Erhaltung der Stammzeleigenschaften von LESC nach Aussaat auf dezellularisiertem Limbus bewirkt (Falsifizierung These 4).

3.1 Voraussetzungen und vorwegnehmende Erläuterungen

Für die Aussaat von LESC auf dezellularisierter Kornea wurden nur morphologisch undif- ferenzierte Zellen verwendet, überprüft mittels Lichtmikroskop (Abb. 6).

Kolonie limbalen epithelialen Stammzellen an Kultivierungstag 14

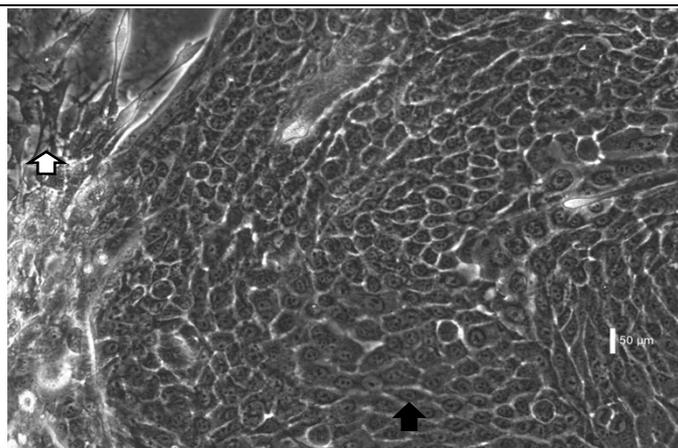


Abb. 6: Dargestellt sind limbale epitheliale Stammzellen (↑) an Kultivierungstag 14 und ein *Feeder- layer* bestehend aus murinen, wachstumshemmenden 3T3-Fibroblasten (⇑). Aufnahme mittels Licht- mikroskop (Leica) in 400-facher Vergrößerung.

In die Auswertung wurden nur Korneae miteinbezogen, die erfolgreich dezellularisiert wurden. Dies wurde zum einen mit Hilfe der HE-Färbung bei jeder re-epithelialisierten Kornea überprüft, zum anderen exemplarisch mittels Feulgen-Staining (Abb. 7).

Feulgen-Staining einer re-epithelialisierten dezellularisierten porcinen Kornea

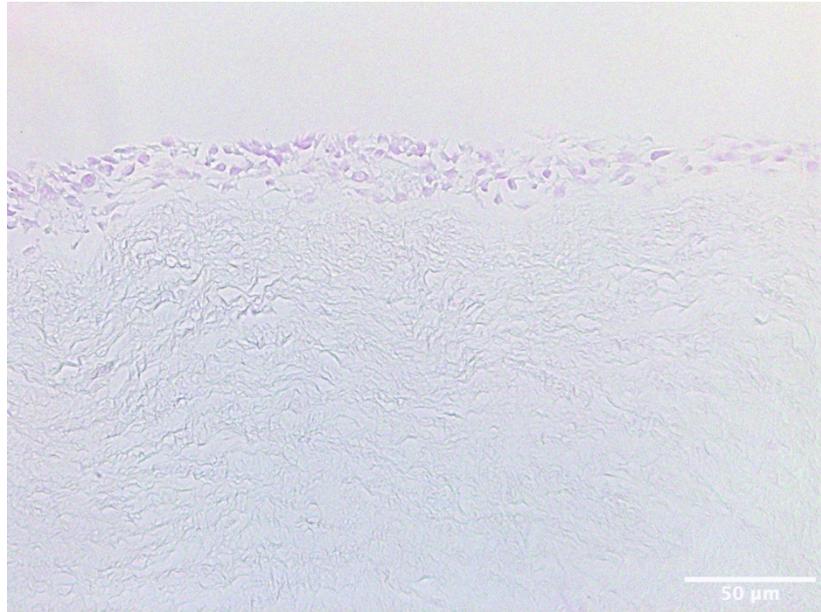


Abb. 7: Zellkerne sind rot-violett angefärbt. Erkennbar ist eine zellfreie (dezellularisierte) porcine Kornea sowie eine erfolgreiche Aussaat eines Epithels. Kultivierung für 21 Tage in konventioneller Kultivierung, Aufnahme mittels Lichtmikroskop, 400x Vergrößerung.

3.2 Durchführbarkeit der Re-Epithelialisierung von dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus mit LESC

Zur Untersuchung, ob eine Expansion von LESC auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus möglich und miteinander vergleichbar ist (erste Aussage These 1, erste Aussage These 2), wurden die in Kapitel 2.2.2.3 beschriebenen Re-Epithelialisierungen durchgeführt. Basierend auf histologischen Untersuchungen fand die Einteilung der re-epithelialisierten Korneae in die Kategorien (1) „erfolgreich“ oder (2) „nicht erfolgreich“ statt (Kap. 2.2.5.2). Daraus ergab sich, dass 67% aller Re-Epithelialisierungen erfolgreich durchgeführt werden konnten.

In Abbildung 8 sind exemplarisch lichtmikroskopische Aufnahmen von HE-Färbungen je einer dezellularisierten humanen und einer porcinen Kornea pro Untersuchungszeitpunkt und Kultivierungsart dargestellt. Die linke Spalte der Bilder zeigt die Re-Epithelialisierung des Limbus, die rechte Spalte die der zentralen Kornea.

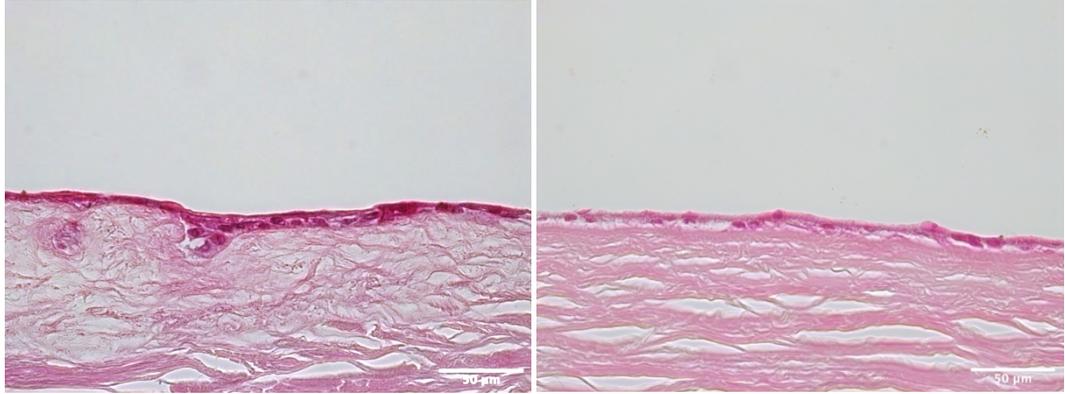
Ergebnisse

Anhand dieser Bilder kann gezeigt werden, dass eine Re-Epithelialisierung des dezellulierten humanen (folgend: humane Probe) und porcinen Limbus (folgend: porcine Probe) sowie der zentralen Kornea möglich ist. Erkennbar sind die Krypten des Limbus sowie die Ansiedlung von Zellen in diesen. Ebenfalls zu sehen ist die Erhaltung der Epithelzellen über drei Wochen sowie eine tendenzielle Steigerung der Schichtanzahl im zeitlichen Verlauf (näheres dazu Kap. 3.3).

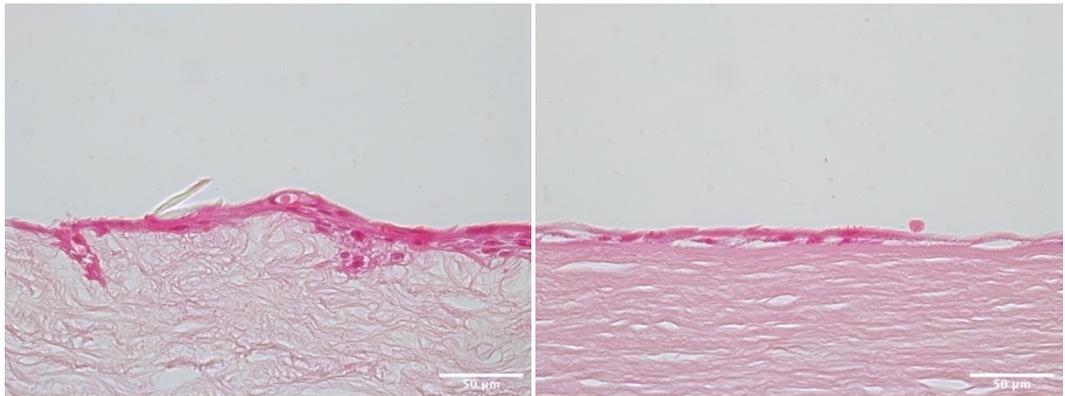
Re-Epithelialisierung von dezellularisierten humanen und porcinen Korneae mit limbalen epithelialen Stammzellen

**Humane Probe
Konventionelle Kultivierung**

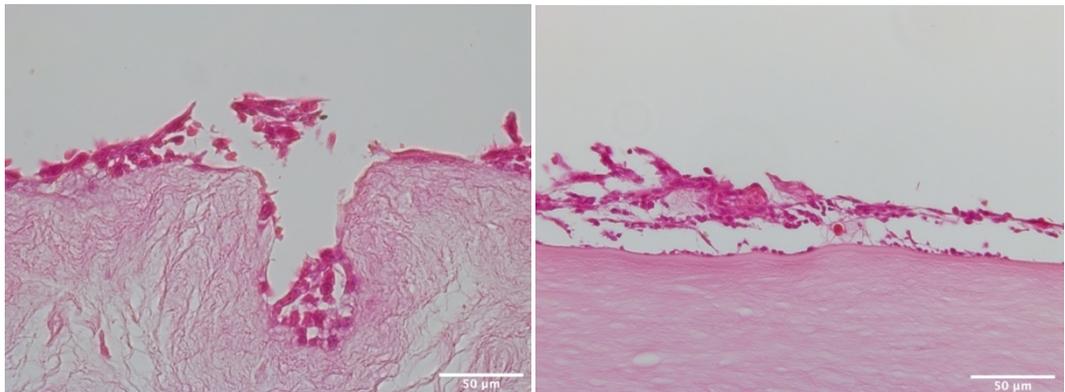
Tag 3



Tag 7



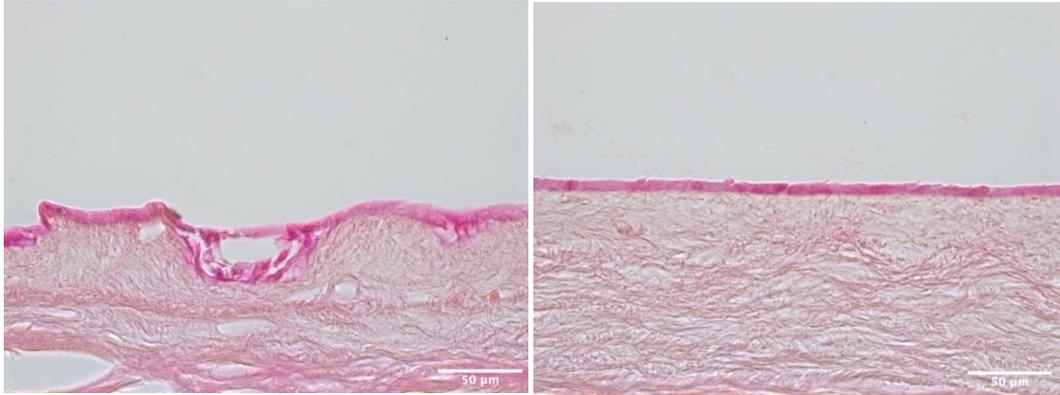
Tag 21



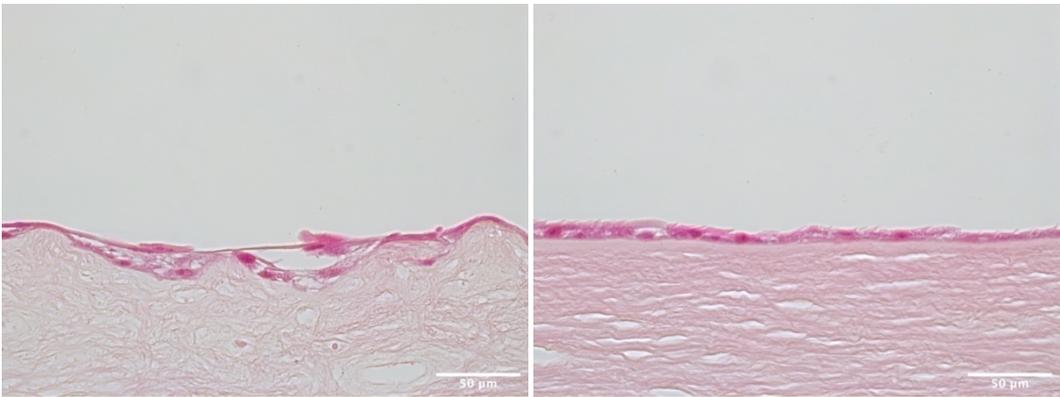
Ergebnisse

Humane Probe
Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze

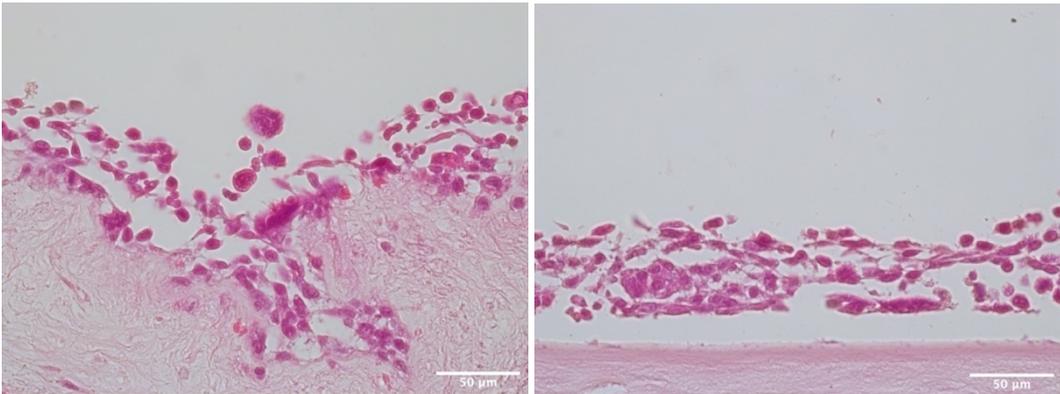
Tag 3



Tag 7



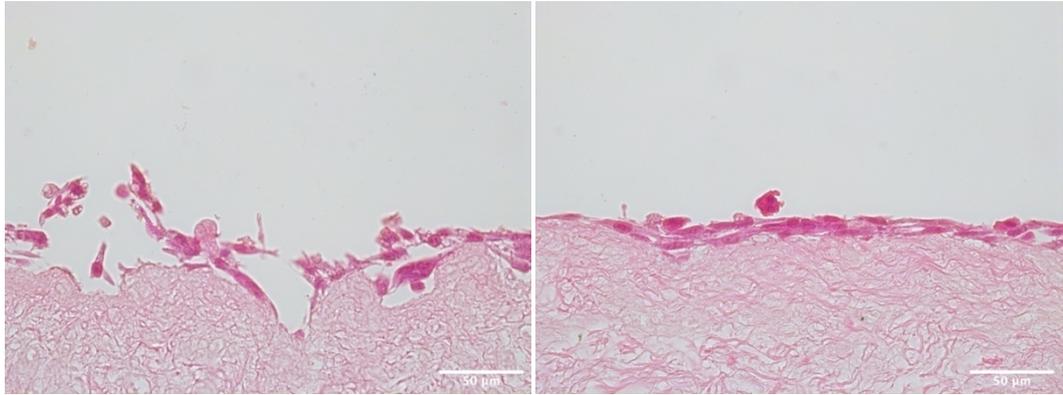
Tag 21



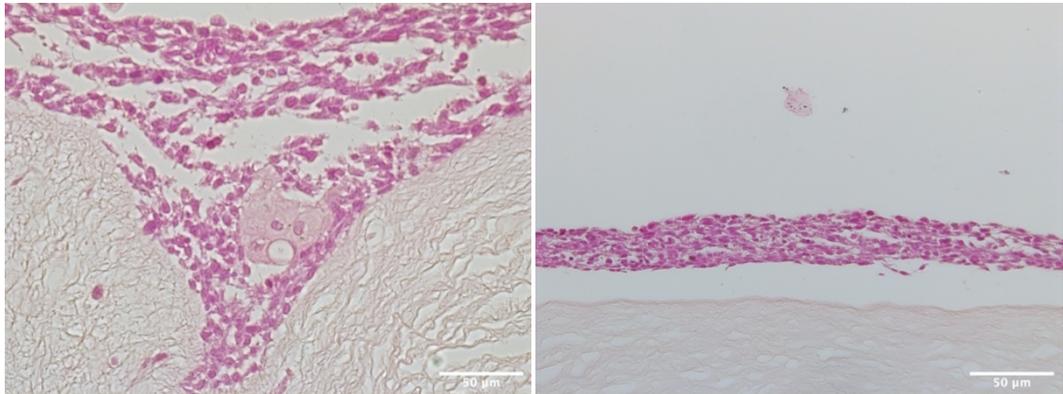
Ergebnisse

Porcine Probe
Konventionelle Kultivierung

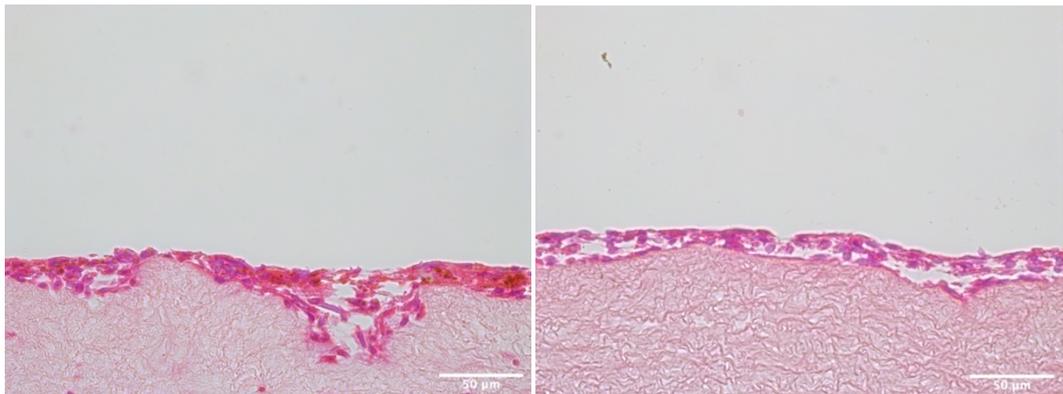
Tag 3



Tag 7

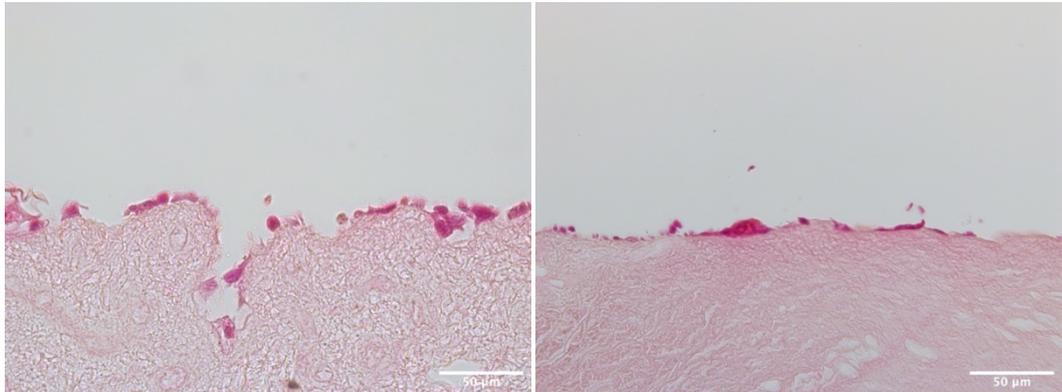


Tag 21

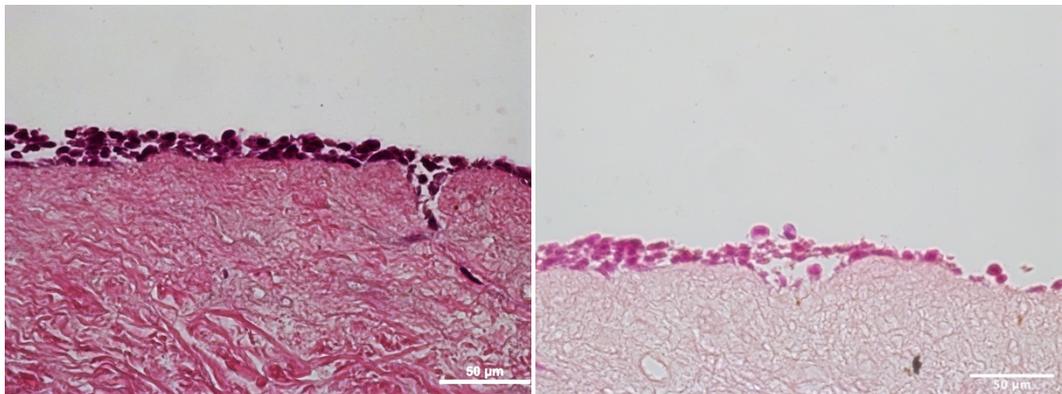


Porcine Probe
Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze

Tag 3



Tag 7



Tag 21

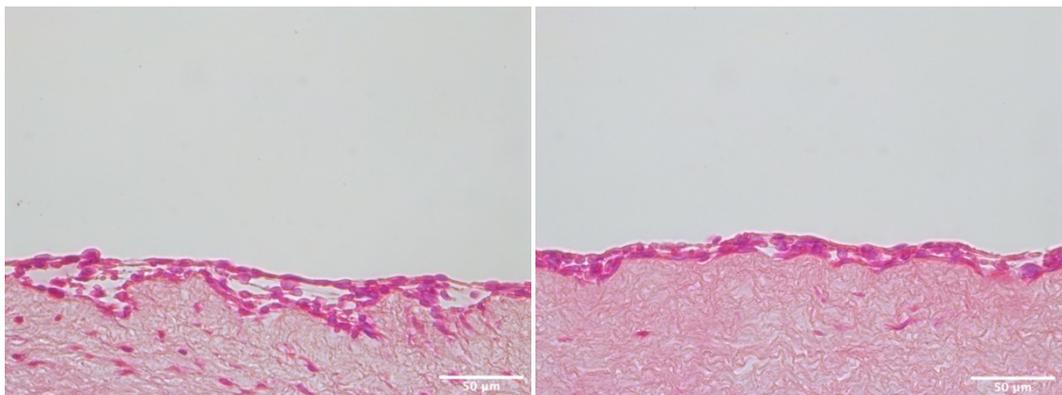


Abb. 8: Darstellung der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Hämatoxylin-Eosin-Färbung in 400x-Vergrößerung. Pro Tabellenabschnitt wird der re-epithelialisierte Limbus (linke Spalte) und die zentrale Kornea (rechte Spalte) an den Kultivierungstagen Tag 3, 7 und 21 bei einer Spezies (human / porcine) in einer Kultivierungsart (konventionell / Luft-Flüssigkeits-Grenze) dargestellt.

Ergebnisse

Um weiterführend den Einfluss einer humanen und einer porcinen dezellularisierten Kornea auf das Ergebnis der Re-Epithelialisierung zu untersuchen, wurde die Einteilung in die oben genannten Kategorien mit der weiteren Unterscheidung nach Spezies und Kultivierungsart vorgenommen. Dies zeigte, dass ungefähr 85% der Re-Epithelialisierungen auf humaner Matrix und ungefähr 56% der Versuche auf porciner Matrix in die Kategorie „erfolgreich“ eingestuft werden konnten.

Tabelle 4: Erfolgsrate der Expansion von limbalen epithelialen Stammzellen auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus

Spezies	Erfolgreich		Nicht erfolgreich	
	Human	Porcin	Human	Porcin
Konventionelle Kultivierung	14	17	3	11
Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenze	15	12	2	12
Insgesamt	29 (85,3%)	29 (55,8%)	5 (14,7%)	23 (44,2%)

Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der in diese Kategorie eingestuften Re-Epithelialisierungen an allen Re-Epithelialisierungen einer Spezies unabhängig von der Kultivierungsart.

Eine logistische Regression diente der Quantifizierung des Einflusses. Als abhängige Variable wurde der Erfolg der Re-Epithelialisierung (Kap. 2.2.5.2) verwendet, als unabhängige Variablen dienten Spezies und Kultivierungsart (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\text{Erfolg Re-Epithelialisierung} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart}$$

Hier stellte sich ein signifikant positiver Effekt humaner Korneae auf den erfolgreichen Ausgang der Re-Epithelialisierung im Vergleich zu porcinen Korneae dar ($\beta_{(\text{Spezies})} = -1,537$, $p_{(\text{Spezies})} = ,006$). Ein Einfluss der Kultivierungsart war nicht signifikant ($\beta_{(\text{Kultivierungsart})} = -,208$, $p_{(\text{Kultivierungsart})} = ,668$).

Es wurde aufgezeigt, dass eine *ex-vivo* Kultivierung von humanen LESC auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus möglich ist (Verifizierung erste Aussage These 1), wobei das Anwachsen der Zellen auf einer humanen Probe erfolgsversprechender ist als auf einer porcinen Probe (Falsifizierung erste Aussage These 2).

3.3 Mehrschichtigkeit des neuen kornealen Epithels

Um die Ausbildung einer Mehrschichtigkeit des kornealen Epithels zu untersuchen, wurden die Zellschichten an allen drei Untersuchungszeitpunkten ausgezählt (Kap. 2.2.3.3). Unterschieden wurde dabei die Lokalisation der Zellen im Limbus und auf der zentralen Kornea. Dies dient der Frage nach einer positiven Auswirkung des ALI auf die Ausbildung von Mehrschichtigkeit (erste Aussage These 4).

In Abbildung 9 werden die Mittelwerte \pm SD der Schichtanzahl des neuen Epithels, ausgesät auf eine dezellularisierte humane oder porcine Kornea, unterteilt in Spezies, Kultivierungsart und Lokalisation in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt.

Zeitlicher Verlauf der Ausbildung von Mehrschichtigkeit des neuen Epithels

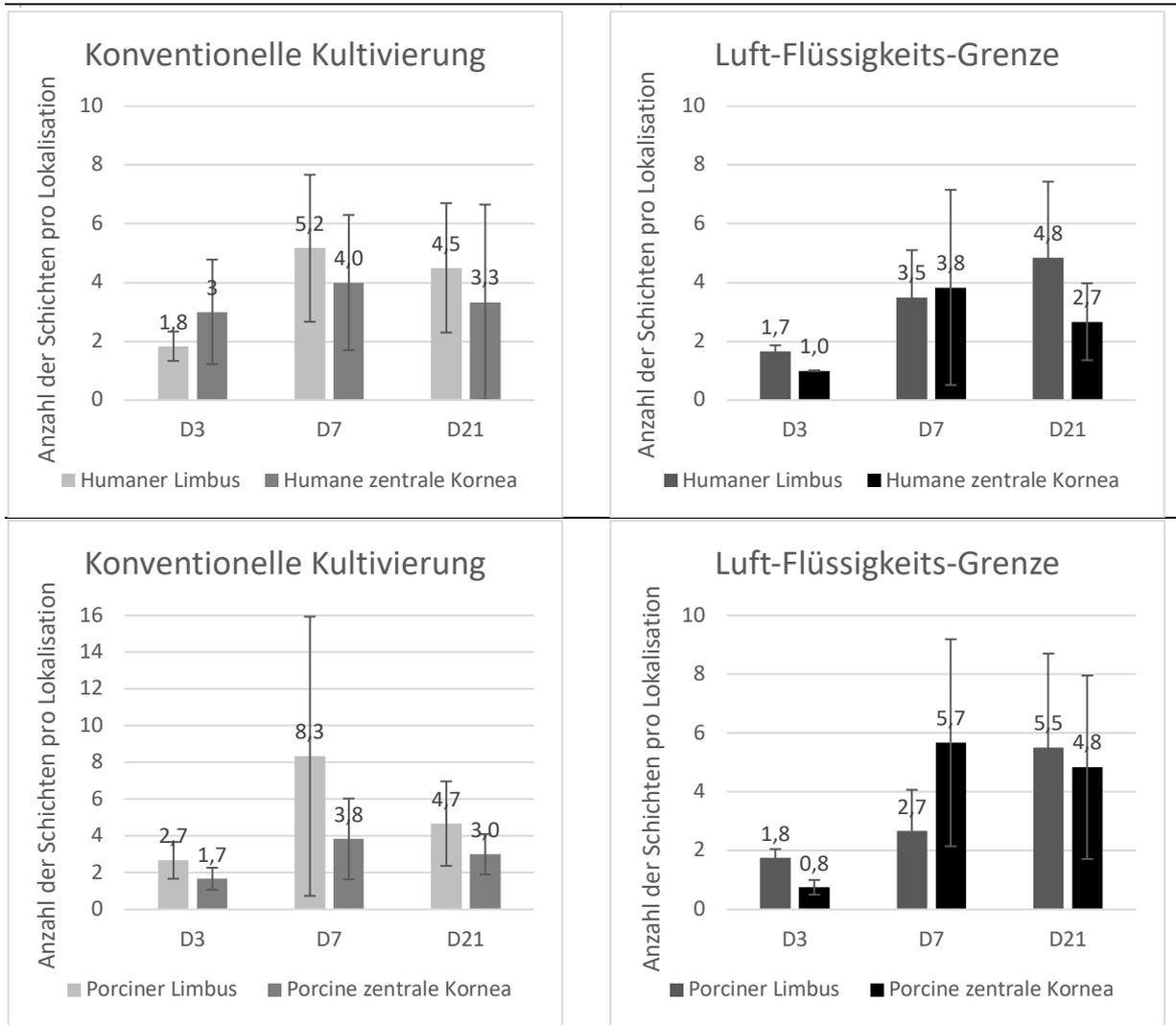


Abb. 9: Dezellularisierte humane und porcine Korneae wurden mit limbalen epithelialen Stammzellen re-epithelialisiert, in konventioneller Kultivierung oder in einer Luft-Flüssigkeits-Grenze inkubiert und an den Tagen 3, 7 und 21 untersucht. Mittels HE-Färbung wurde die Epithelzellschichtanzahl im Limbus sowie auf der zentralen Kornea ausgezählt und abhängig von der Spezies und Kultivierungsart als Mittelwerte (\pm SD) in einem zeitlichen Verlauf dargestellt.

Ein Anstieg der Schichtanzahl zwischen Tag 3 und Tag 7 konnte unabhängig von Spezies, Kultivierungsart und Lokalisation der Zellen nachgewiesen werden ($t(90) = -3,678, p = < ,001$). Als signifikant wurde die steigende Schichtanzahl im humanen Limbus bis Tag 7 unter beiden Kultivierungsarten detektiert (Konventionelle Kultivierung, human, Limbus, D3 \rightarrow D7: $t(10) = -2,702; p = ,022$; ALI, human, Limbus, D3 \rightarrow D7: $t(10) = -2,314, p = ,043$). Eine signifikante Erhöhung der Schichtanzahl über einen Zeitraum von 21 Tagen wurde im humanen Limbus unter beiden Kultivierungsarten sowie für die humane zentrale Kornea unter ALI-Bedingungen nachgewiesen (Human, D3 \rightarrow D21: Konventionelle Kultivierung, Limbus: $t(10) = -2,423, p = ,036$; ALI, Limbus: $t(10) = -2,274, p = ,046$; ALI,

Zentrale Kornea: $t(10) = -2,331$, $p = ,042$). Weitere signifikante Steigerungen der Schichten konnten nicht nachgewiesen werden (Anhang, Kap. 6.3).

In Abbildung 9 sind weitere Tendenzen erkennbar, die trotz fehlender Signifikanz nachstehend erwähnt werden (Anhang, Kap. 6.3). Trotz insgesamt Steigerung der Schichtanzahl über einen Zeitraum von drei Wochen, ist ein Abfall der Schichten zwischen Tag 7 und 21 auf beiden Spezies unter beiden Kultivierungsarten zu erkennen. Eine Ausnahme stellen hierbei jeweils der humane und porcine Limbus unter ALI dar; dort steigen die Zellschichten von Tag 7 zu Tag 21.

In einem weiterführenden Schritt wurde eine Analyse der möglichen, für die Ausbildung einer Mehrschichtigkeit verantwortlichen Faktoren durchgeführt (Tab. 5). Als abhängige Variable wurde die Epithelstratifizierung (Kap. 2.2.5.2), als unabhängige Variablen Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation eingesetzt (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\text{Epithelstratifizierung} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart} + \beta_3 \times \text{Kultivierungsdauer} + \beta_4 \times \text{Lokalisation}$$

Tabelle 5: Einflussfaktoren auf die Ausbildung von Mehrschichtigkeit

	Regressionskoeffizient B	p-Wert	95%-KI
Spezies	,582	,320	[-,570; 1,733]
Kultivierungsart	-,530	,365	[-1,681; ,622]
Kultivierungsdauer	1,126	,002	[,416; 1,837]
Lokalisation	-,771	,187	[-1,921; ,379]

Untersucht wurde der Einfluss von Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation auf die Ausbildung eines mehrschichtigen Epithels durch LESC, ausgesät auf dezellularisierte humane oder porcine Korneae. Datenerhebung mittels multipler linearer Regression. ($R^2 = ,091$, $p \leq ,05$)

Die Kultivierungsdauer übt den stärksten Einfluss auf die Ausbildung der Mehrschichtigkeit aus. Je länger die re-epithelialisierten Korneae kultiviert wurden, desto mehr Schichten bildete das Epithel aus ($\beta_{(\text{Kultivierungsdauer})} = 1,126$). Dieser Effekt konnte als signifikant nachgewiesen werden ($p_{(\text{Kultivierungsdauer})} = ,002$). Die Variablen Spezies und Kultivierungsart übten keinen signifikanten Unterschied auf die Ausbildung von Mehrschichtigkeit aus ($\beta_{(\text{Spezies})} = ,582$, $p_{(\text{Spezies})} = ,320$; $\beta_{(\text{Kultivierungsart})} = -,530$, $p_{(\text{Kultivierungsart})} = ,365$). Auch der Effekt der Variable Lokalisation war nicht signifikant belegbar ($\beta_{(\text{Lokalisation})} = -,771$, $p_{(\text{Lokalisation})} = ,187$).

Allerdings zeigte sich eine Tendenz zu einer geringeren Schichtdicke, wenn die Stammzellen auf der zentralen Kornea und nicht auf dem Limbus wuchsen.

Als Ergebnis wird die erste Aussage von These 4 falsifiziert, da ein ALI die Ausbildung einer Mehrschichtigkeit des neuen Epithels nicht belegbar begünstigt, sondern die Kultivierungsdauer als signifikanter Einfluss detektiert wurde.

3.4 Erhalt der Progenitorzeleigenschaften

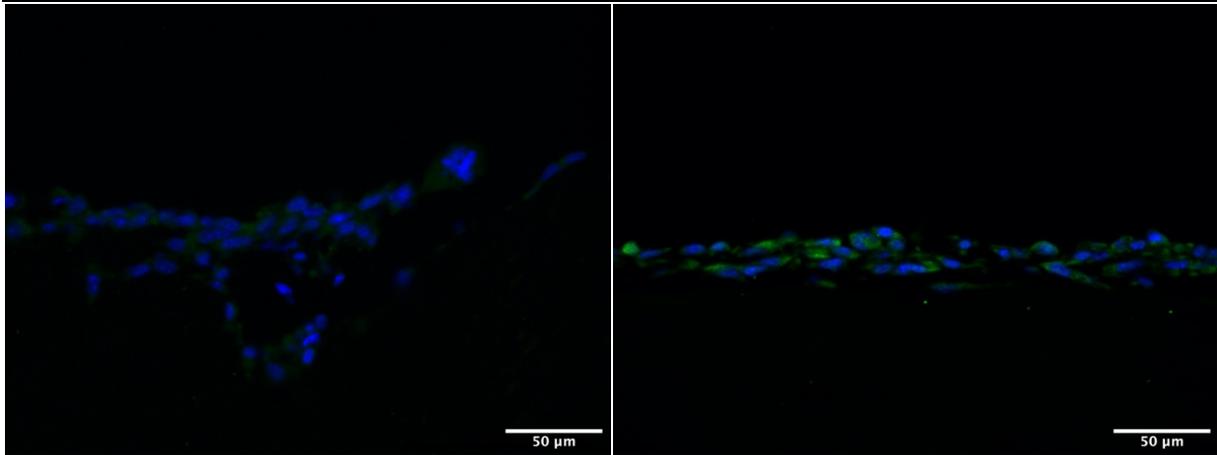
3.4.1 Immunhistochemische Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der re-epithelialisierten, dezellularen Korneae diente der Analyse des Erhalts der Stammzeleigenschaften nach Aussaat auf dezellularem Limbus und somit der Überprüfung der darauf bezugnehmenden Aussagen von Thesen 1, 2, 3 und 4. Untersucht wurden die Proteine ABCG2, p63 α , CK 3, 12 und 15, Ki67 und Caspase 3. Die Anzahl der antikörper-positiven Zellen wurde in ein Verhältnis mit der Gesamtzellzahl gesetzt (ermittelt mittels Auszählung nach Färbung mit DAPI) mit Unterscheidung zwischen Zellen, die im Limbus und Zellen, die auf der zentralen Kornea lagen.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der immunhistochemischen Färbungen werden folgend abgebildet (Abb. 10). Zu sehen sind alle untersuchten Marker in einer Gegenüberstellung zwischen Limbus und zentraler Kornea am jeweils gleichen Zeitpunkt. Die Aufnahmen sollen einen Eindruck über die Ergebnisse geben. Aus Übersichtsgründen konnte nicht jeder Marker an jedem Zeitpunkt in jeder Kultivierungsart bei jeder Spezies dargestellt werden. Deswegen wurden exemplarisch die folgenden Aufnahmen ausgewählt, um ein breites Spektrum der Ergebnisse abzubilden. Zu erkennen ist die erfolgreiche Re-Epithelialisierung des dezellularen Limbus sowie der zentralen Kornea. In den Krypten des Limbus finden sich sowohl progenitorzellmarker-positive Zellen als auch welche, die positiv für die Marker von differenzierten kornealen Epithelzellen sind. In den folgenden Abschnitten wird auf die Auswertung dieser Färbungen eingegangen.

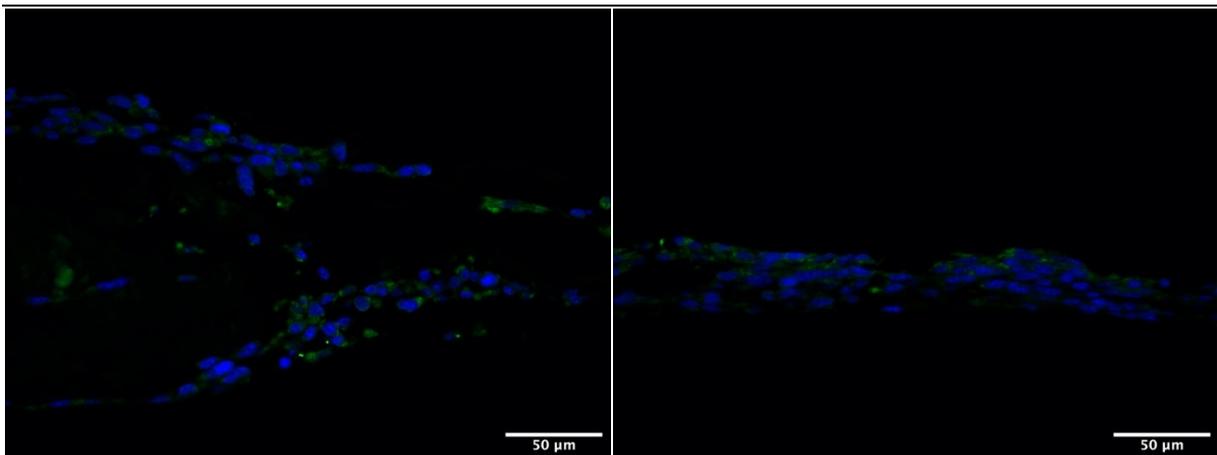
**Fluoreszenzfärbungen limbalen epithelialer Stammzellen nach Aussaat auf de-
zellularisierter humaner oder porciner Kornea**

ABCG2



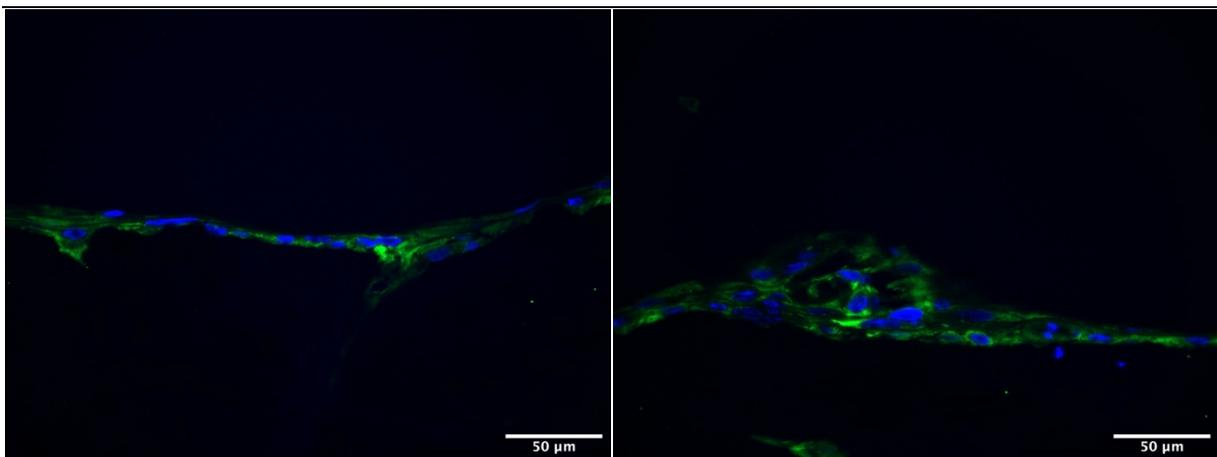
Tag 3, KK, porciner Limbus

Tag 3, KK, humane zentrale Kornea



Tag 7, KK, humaner Limbus

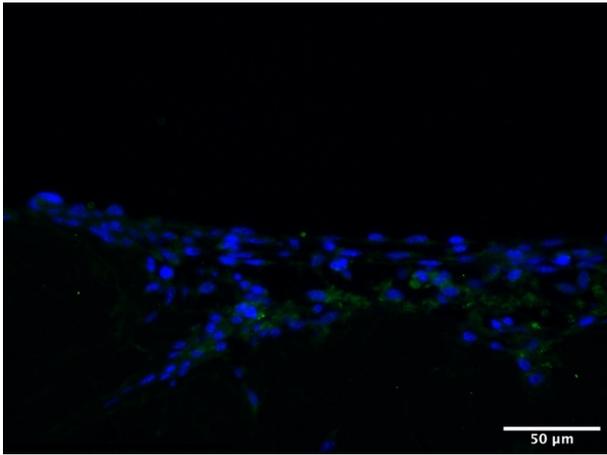
Tag 7, KK, humane zentrale Kornea



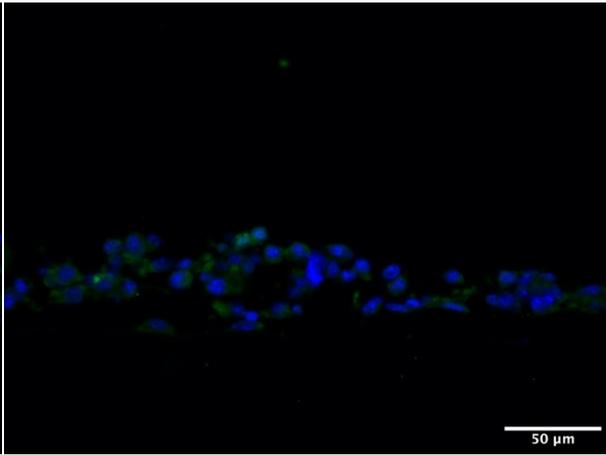
Tag 7, KK, porciner Limbus

Tag 7, KK, porcine zentrale Kornea

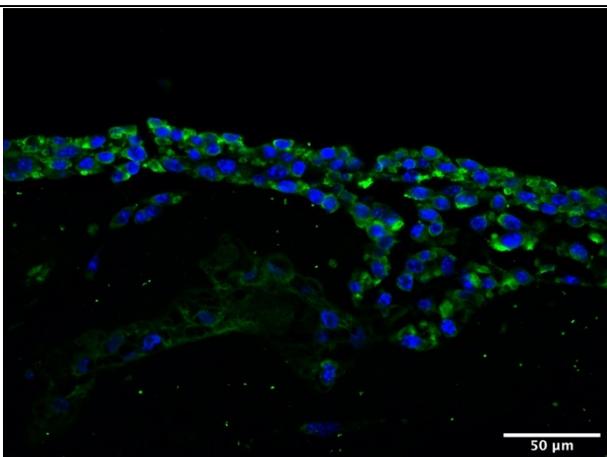
Ergebnisse



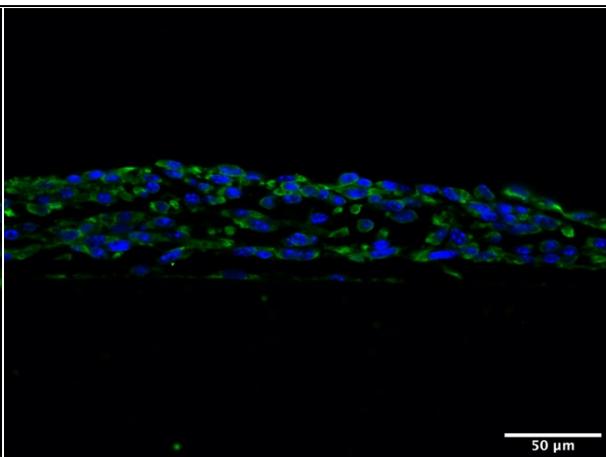
Tag 21, ALI, porciner Limbus



Tag 21, ALI, humane zentrale Kornea

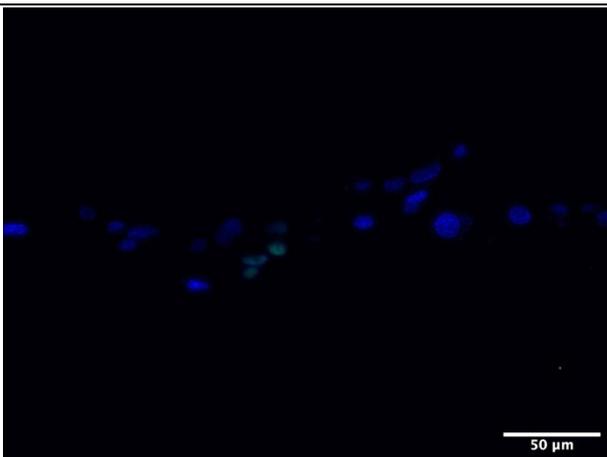


Tag 21, KK, humaner Limbus

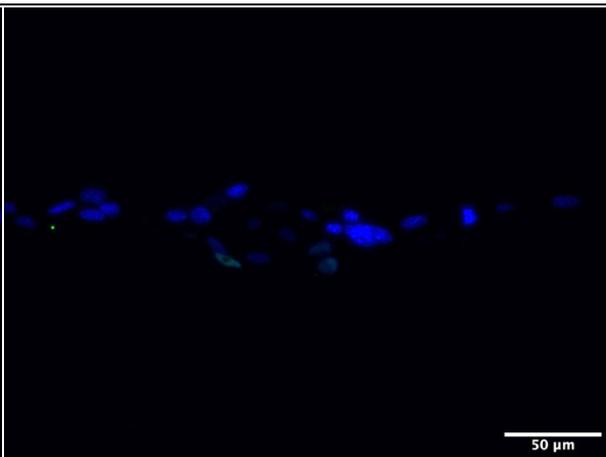


Tag 21, KK, humane zentrale Kornea

p63a

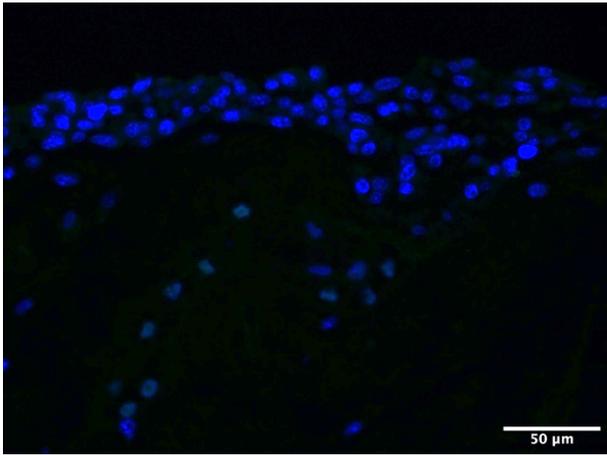


Tag 3, KK, porciner Limbus

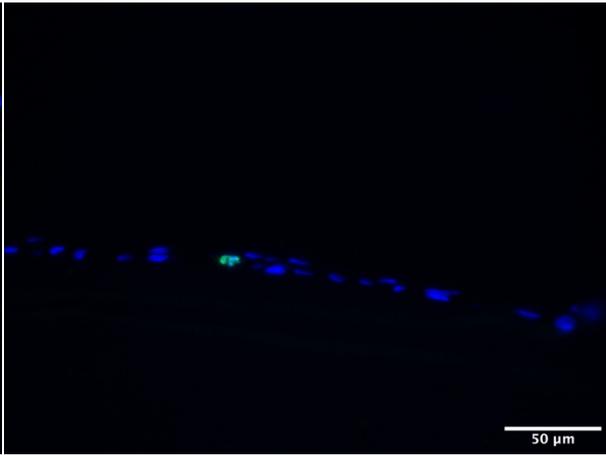


Tag 3, KK, porcine zentrale Kornea

Ergebnisse

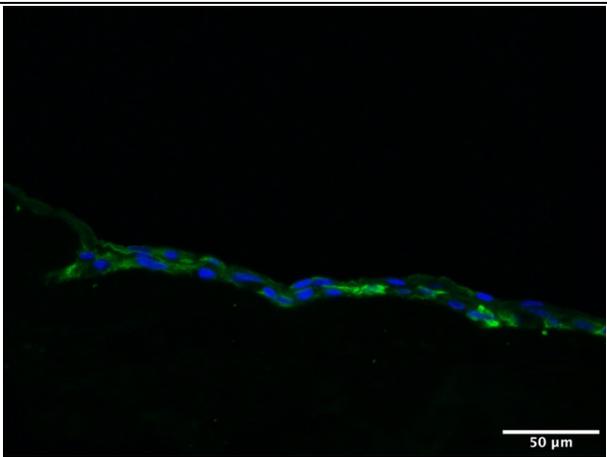


Tag 21, KK, humaner Limbus

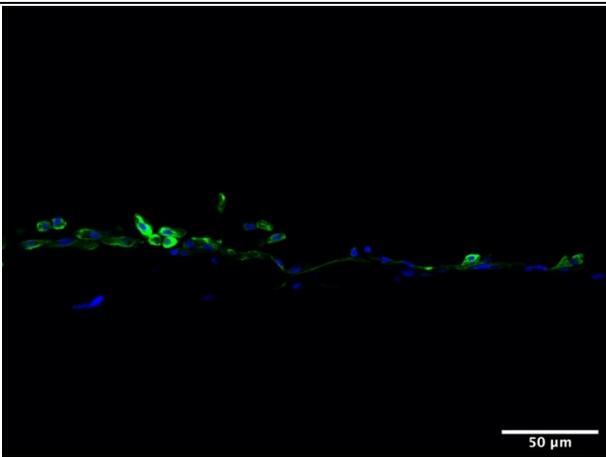


Tag 21, KK, humane zentrale Kornea

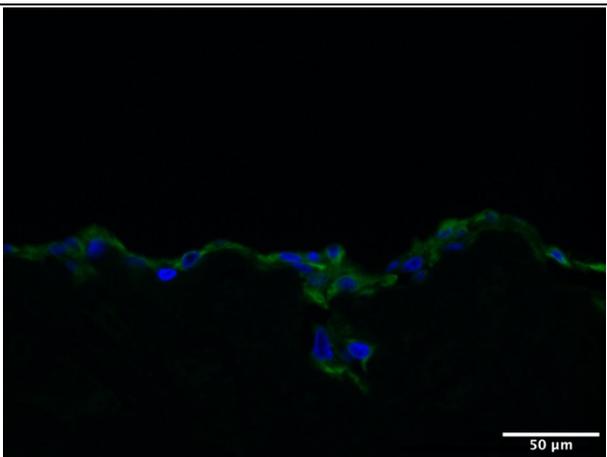
Cytokeratin 15



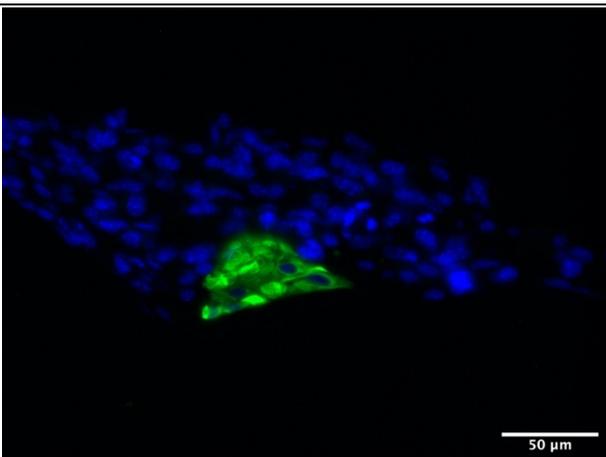
Tag 3, KK, humaner Limbus



Tag 3, KK, humane zentrale Kornea

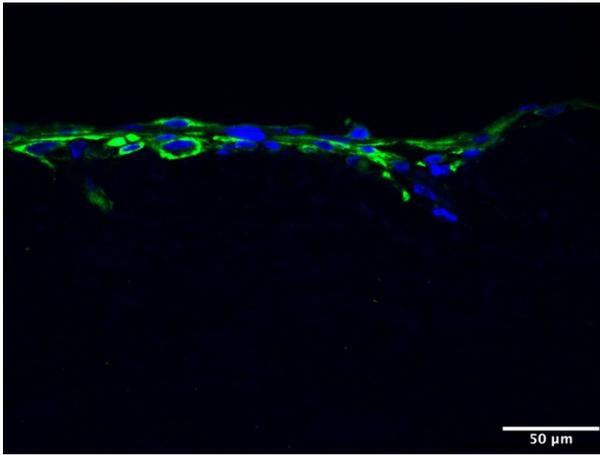


Tag 3, ALI, porciner Limbus

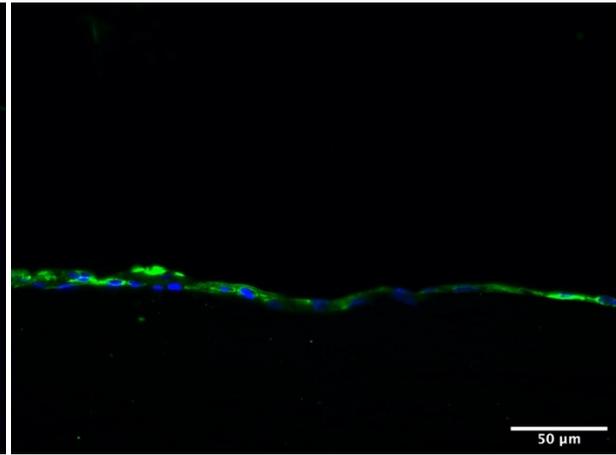


Tag 3, KK, porcine zentrale Kornea

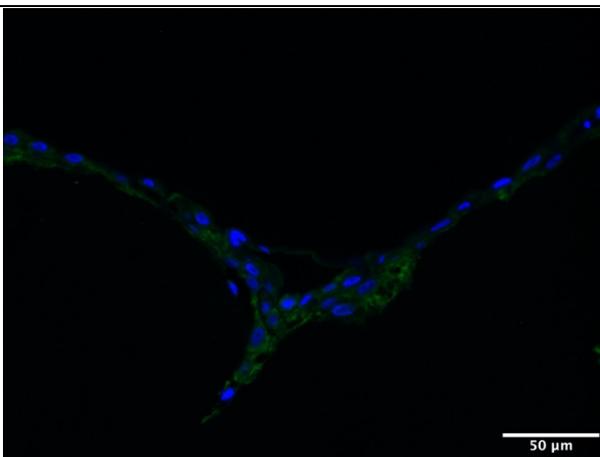
Ergebnisse



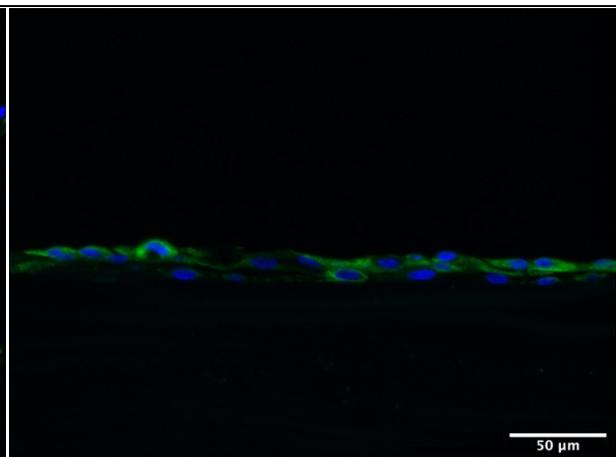
Tag 7, KK, humaner Limbus



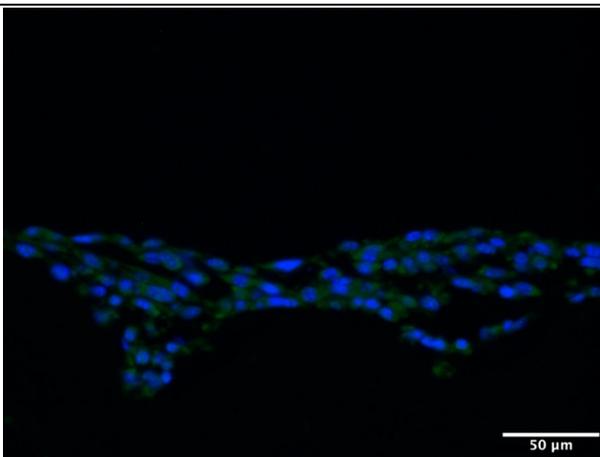
Tag 7, KK, porcine zentrale Kornea



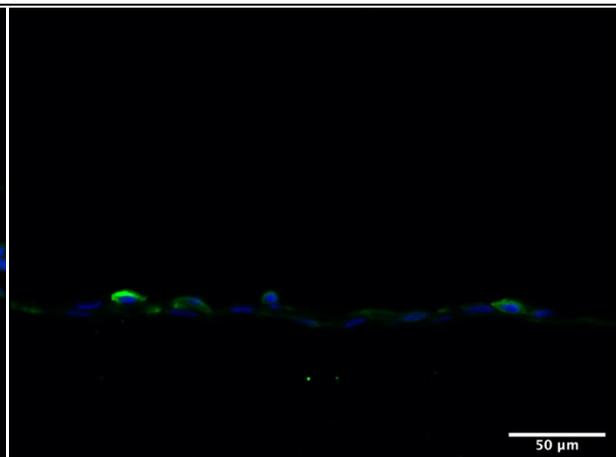
Tag 21, ALI, porciner Limbus



Tag 21, ALI, humane zentrale Kornea

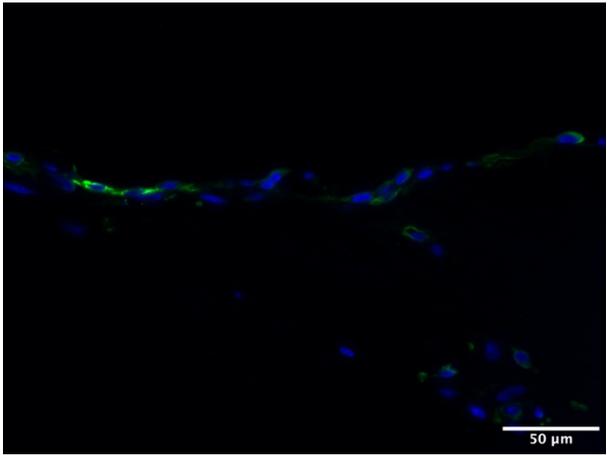


Tag 21, KK, porciner Limbus

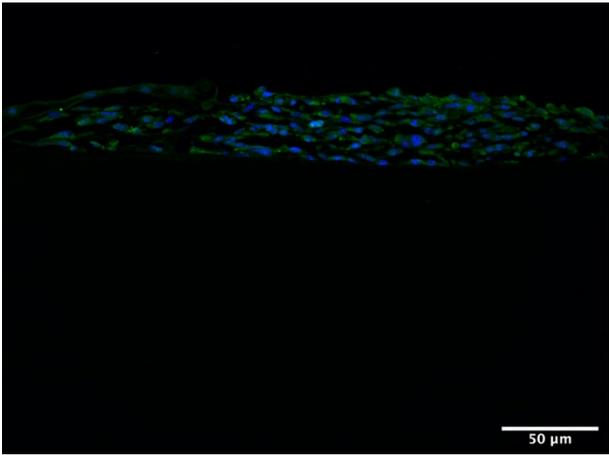


Tag 21, KK, porcine zentrale Kornea

Ergebnisse

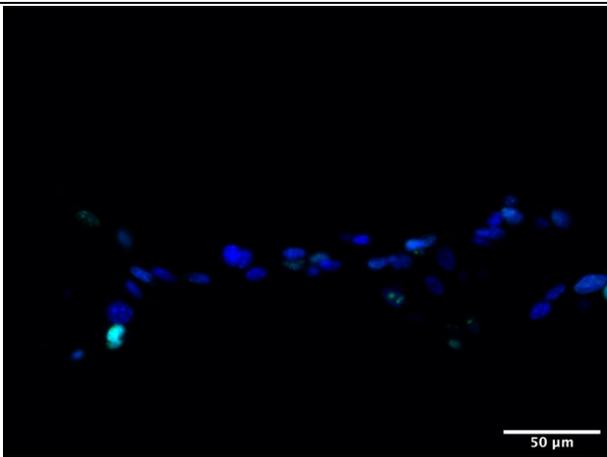


Tag 21, KK, humaner Limbus

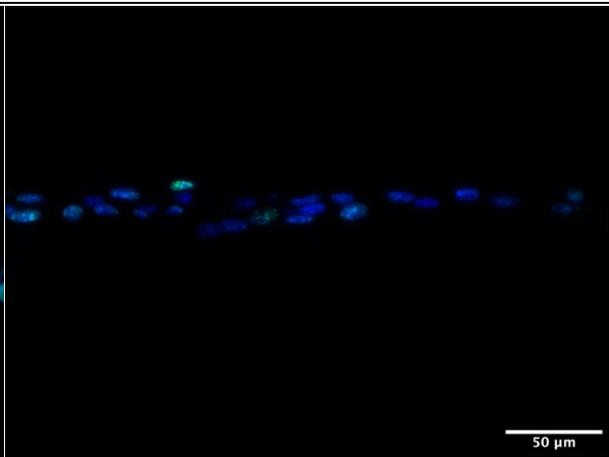


Tag 21, KK, humane zentrale Kornea

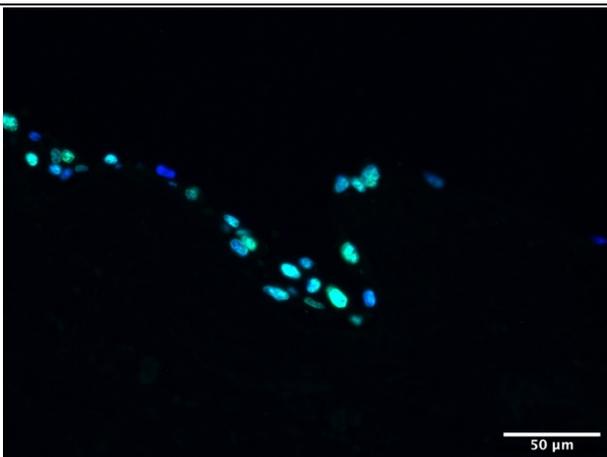
Ki67



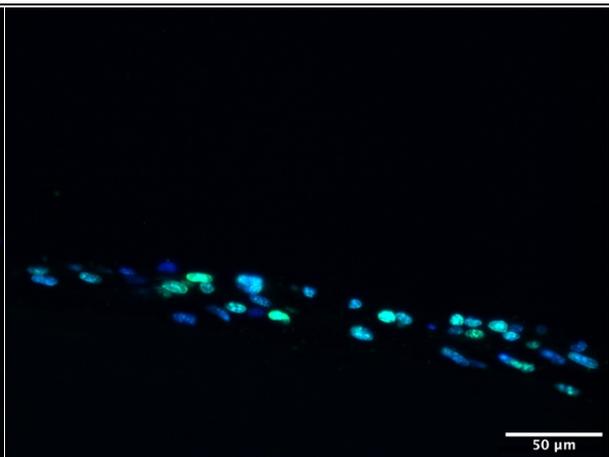
Tag 3, KK, porciner Limbus



Tag 3, KK, porcine zentrale Kornea

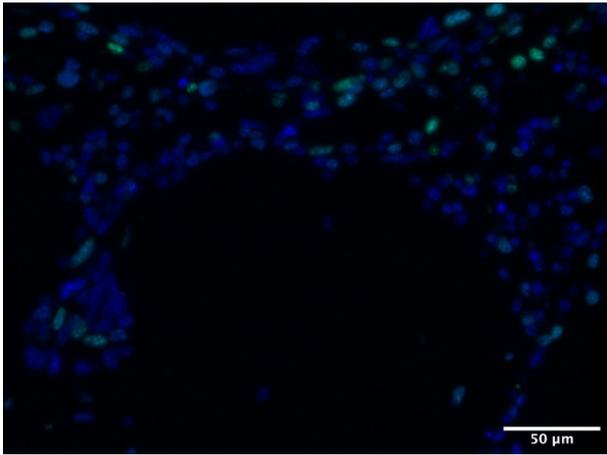


Tag 3, KK, humaner Limbus

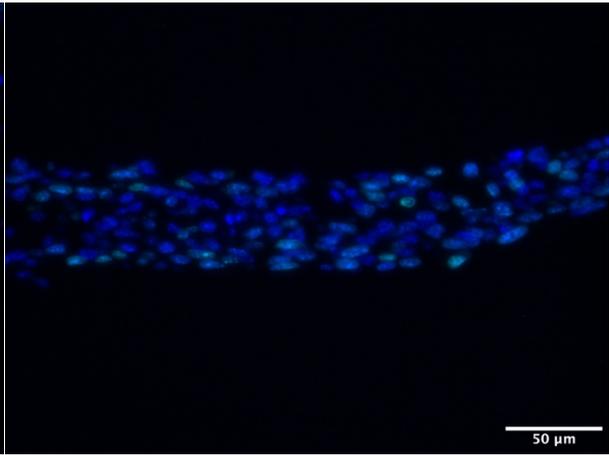


Tag 3, KK, humane zentrale Kornea

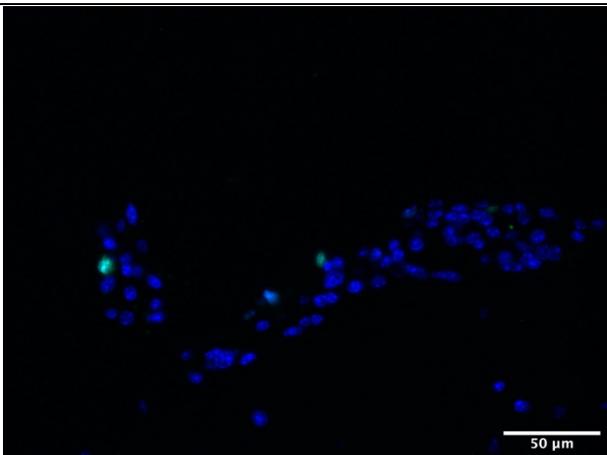
Ergebnisse



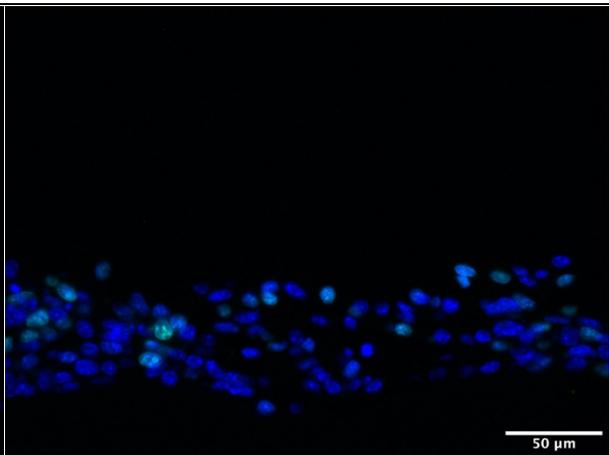
Tag 7, KK, porciner Limbus



Tag 7, KK, porcine zentrale Kornea

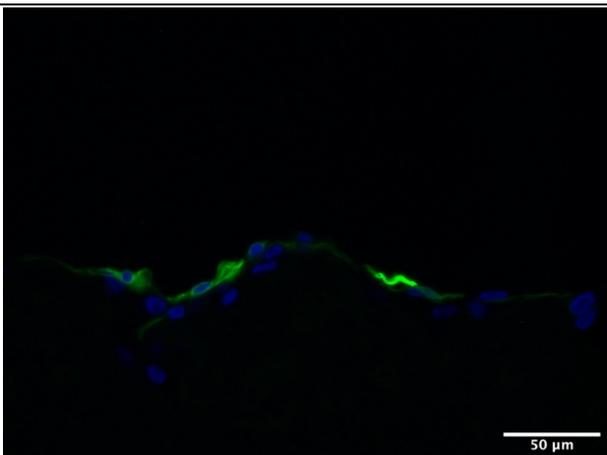


Tag 21, KK, humaner Limbus

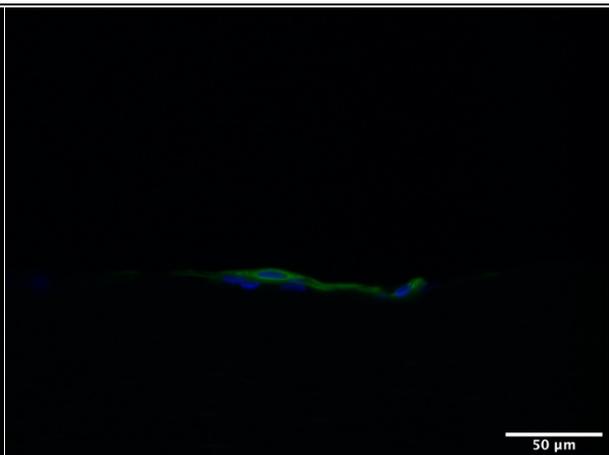


Tag 21, ALI, porcine zentrale Kornea

Cytokeratin 12

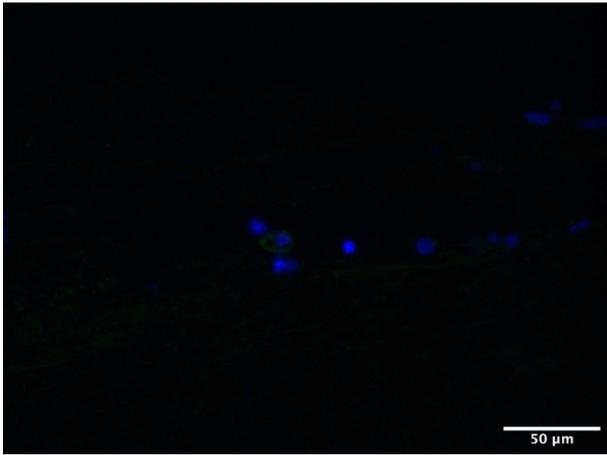


Tag 3, ALI, porciner Limbus

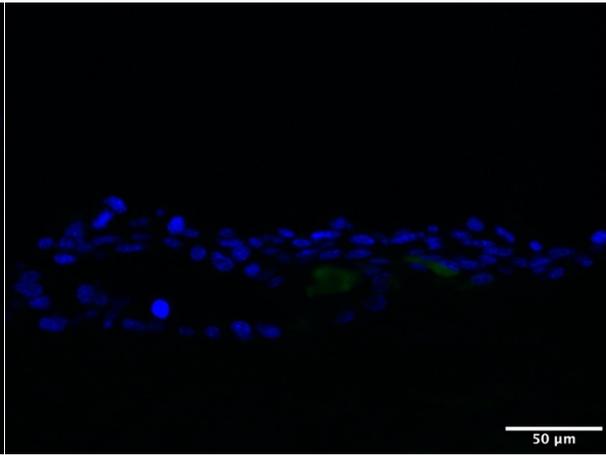


Tag 3, ALI, porcine zentrale Kornea

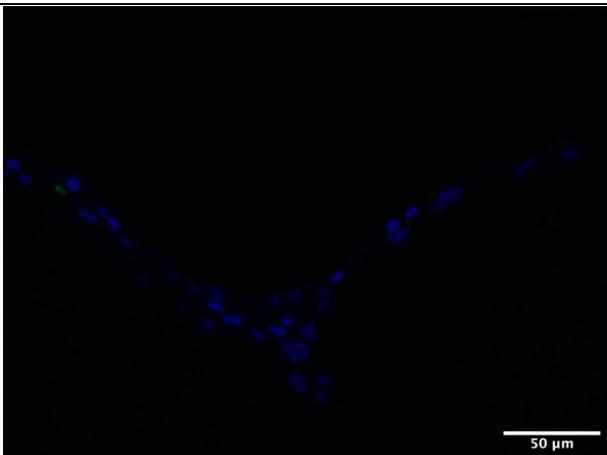
Ergebnisse



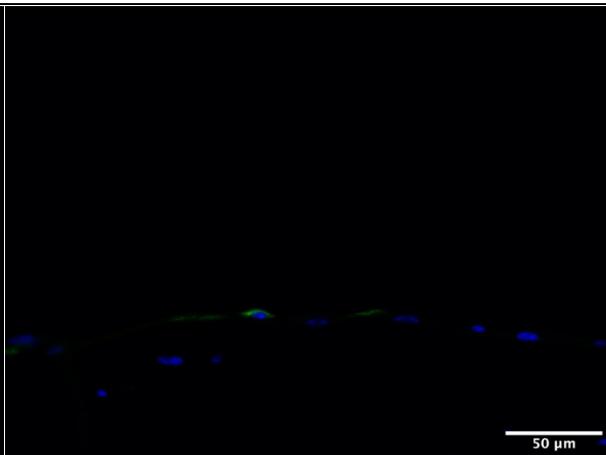
Tag 7, ALI, humaner Limbus



Tag 7, ALI, humane zentrale Kornea

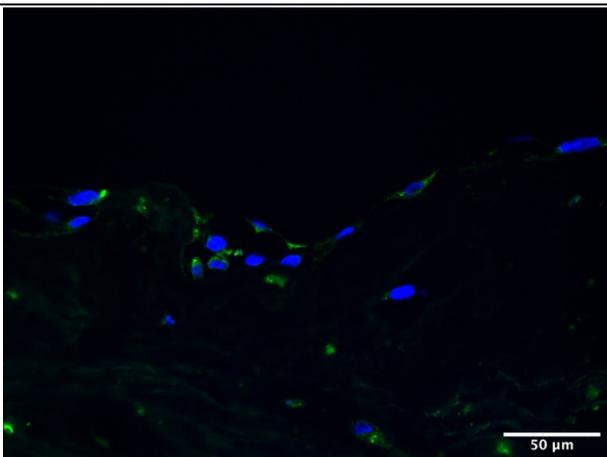


Tag 21, KK, porciner Limbus

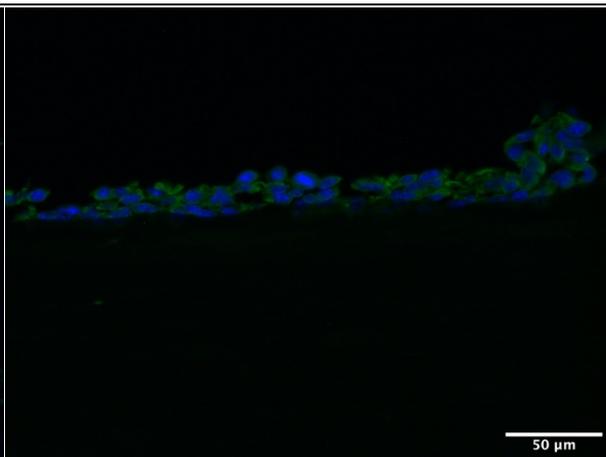


Tag 21, KK, porcine zentrale Kornea

Cytokeratin 3

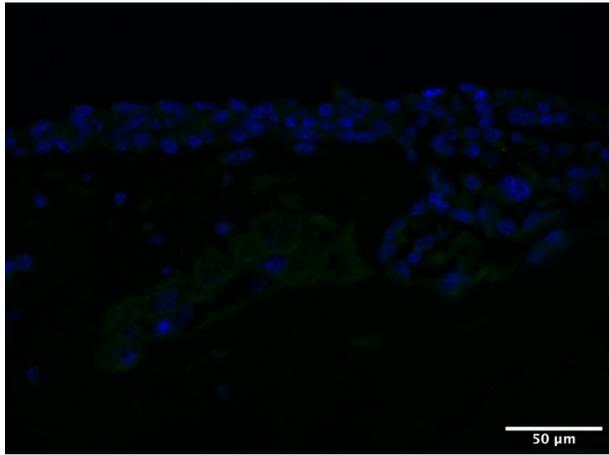


Tag 7, ALI, humaner Limbus

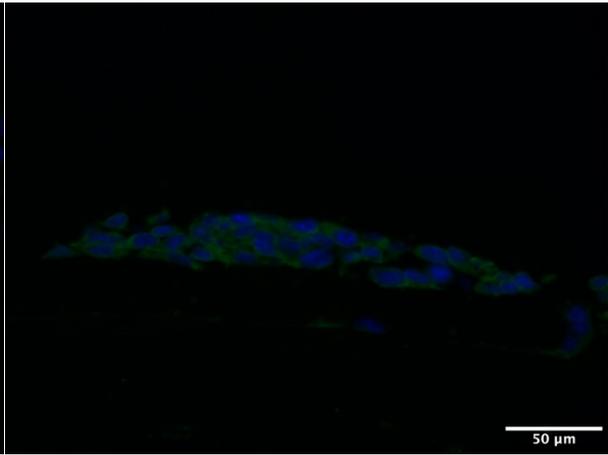


Tag 7, KK, humane zentrale Kornea

Ergebnisse

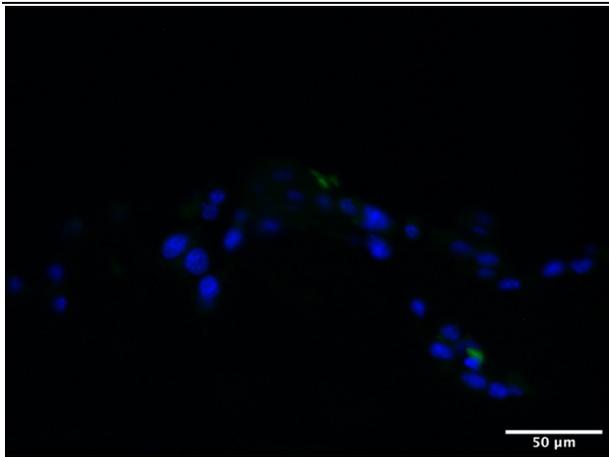


Tag 21, KK, humaner Limbus

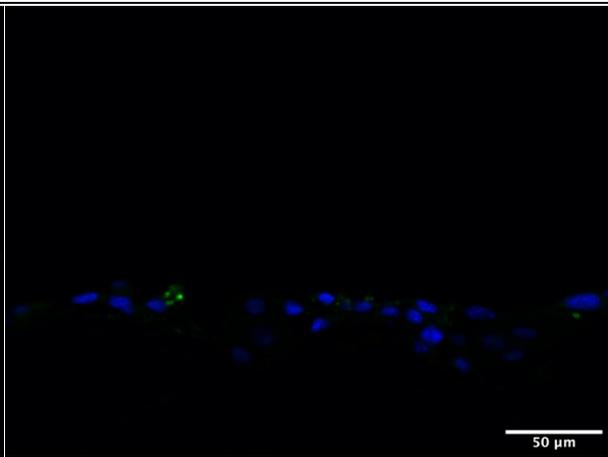


Tag 21, KK, humane zentrale Kornea

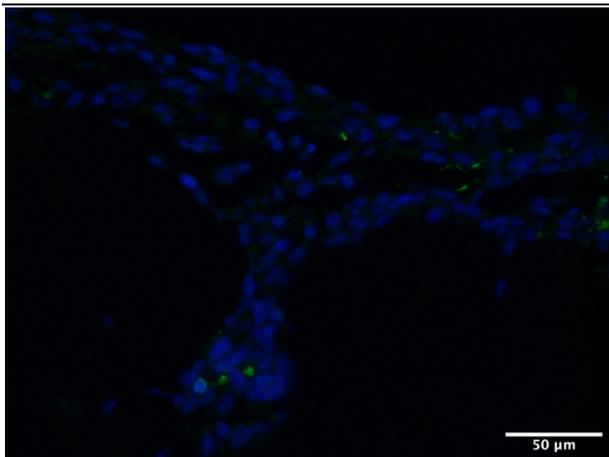
Caspase 3



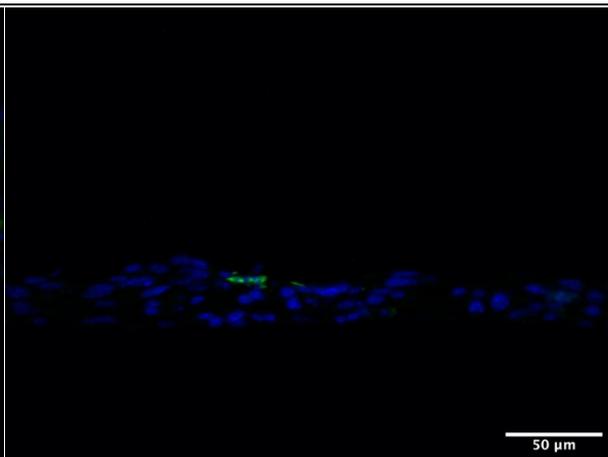
Tag 3, KK, porciner Limbus



Tag 3, KK, porcine zentrale Kornea

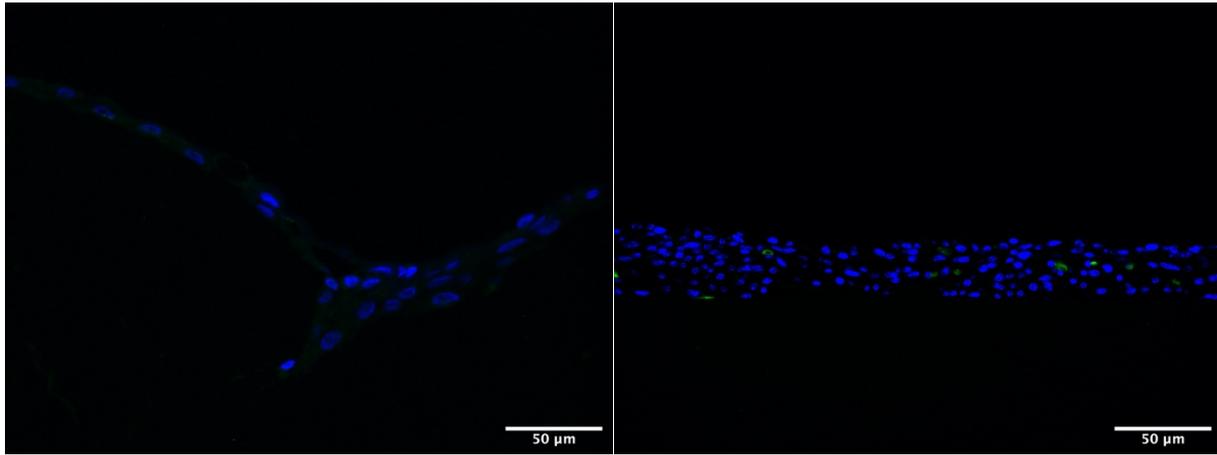


Tag 7, KK, porciner Limbus



Tag 7, KK, humane zentrale Kornea

Ergebnisse



Tag 21, ALI, porciner Limbus

Tag 21, KK, humane zentrale Kornea

Abb. 10: Dezellularisierte und mit limbalen epithelialen Stammzellen re-epithelialisierte humane und porcine Korneae. ABCG2, p63 α , Cytokeratin 3, 12 und 15, Ki67 und Caspase 3 wurden detektiert. Linke Spalte: Limbus; rechte Spalte: zentrale Kornea. KK: Konventionelle Kultivierung, ALI: Luft-Flüssigkeits-Grenze (*air liquid interface*). Zellkerne sind mittels DAPI blau, antikörper-positive Zellen grün gefärbt. Aufnahme mittels Lichtmikroskop in 400x-Vergrößerung.

Ergebnisse

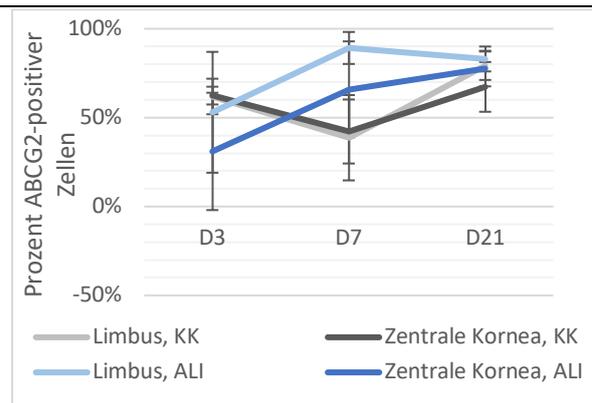
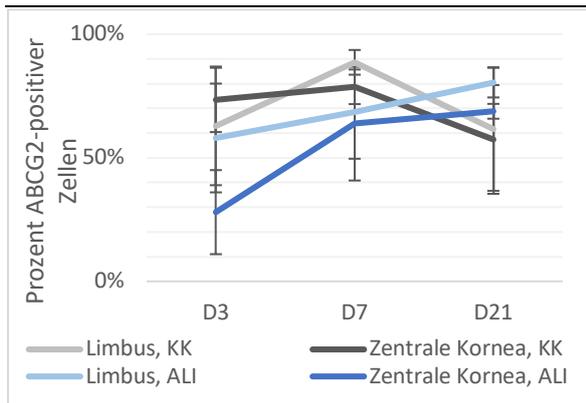
In der folgenden Abbildung werden die prozentualen Anteile der antikörper-positiven Zellen an den Zeitpunkten Tag 3, 7 und 21, aufgeteilt nach Spezies, Kultivierungsart und Lokalisation, dargestellt.

Proteinexpression von LESC nach Re-Epithelialisierung auf dezellularisierter humaner oder porciner Kornea

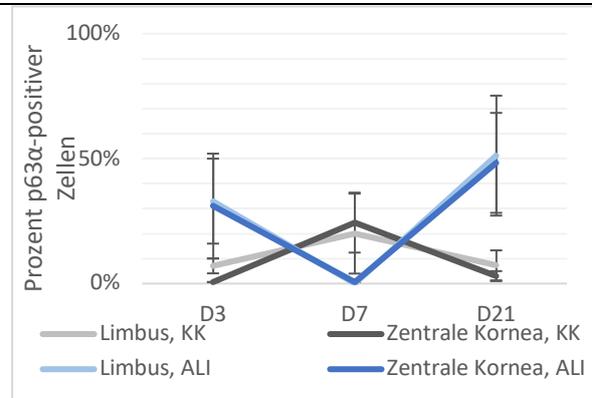
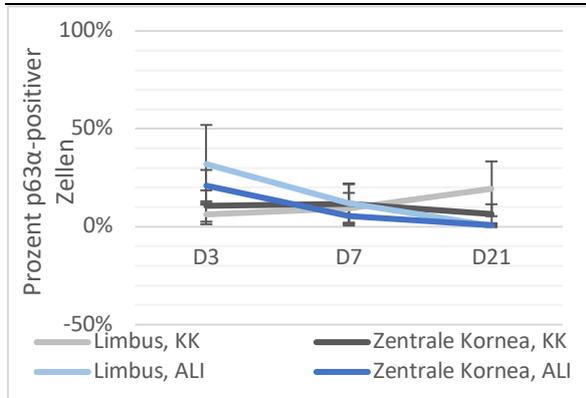
Humane Proben

Porcine Proben

ABCG2



p63α

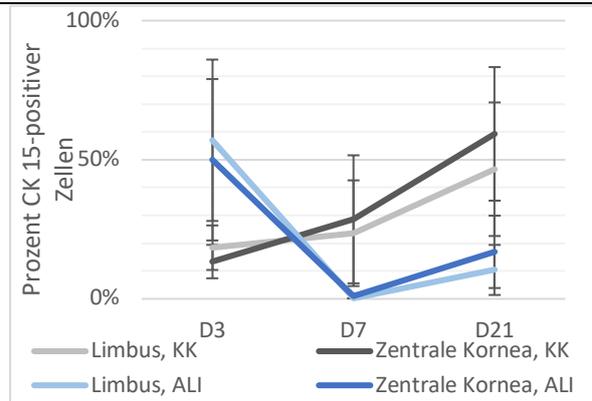
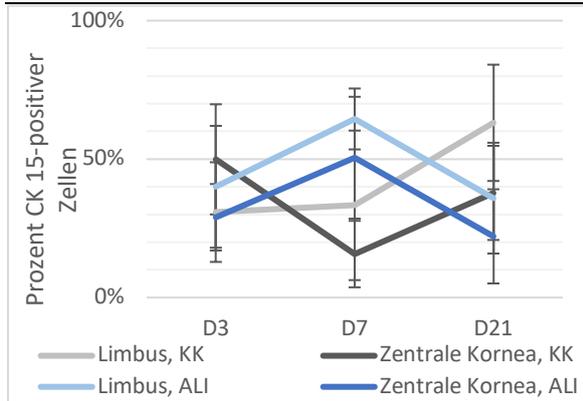


Ergebnisse

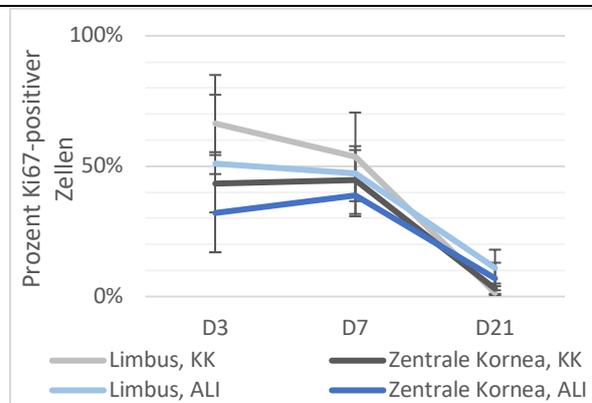
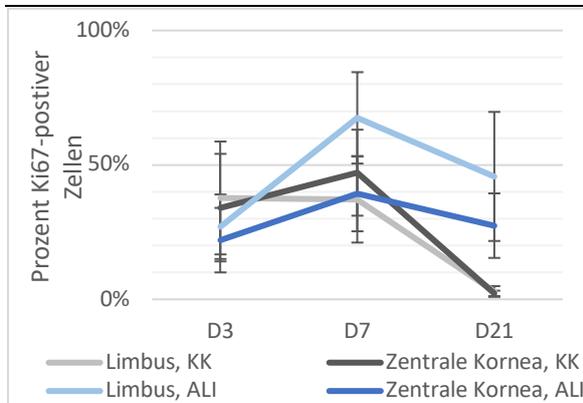
Humane Proben

Porcine Proben

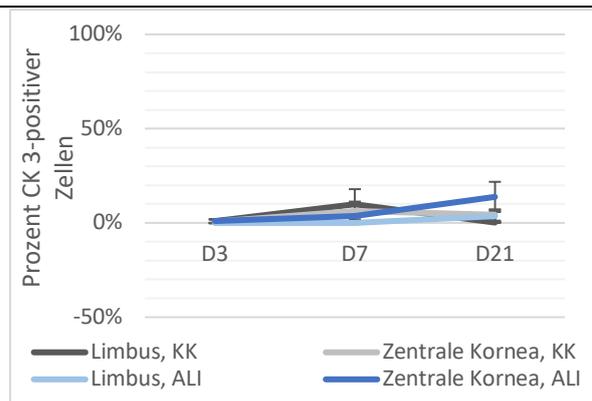
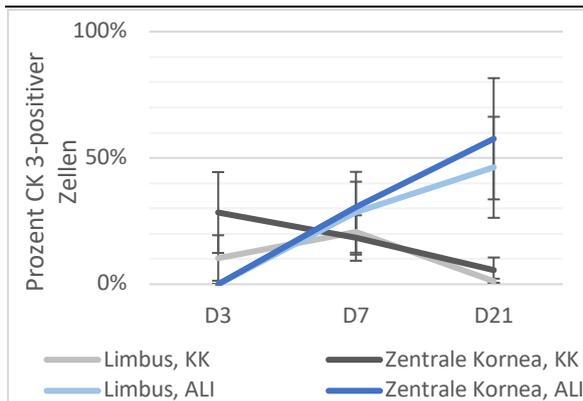
Cytokeratin 15



Ki67



Cytokeratin 3



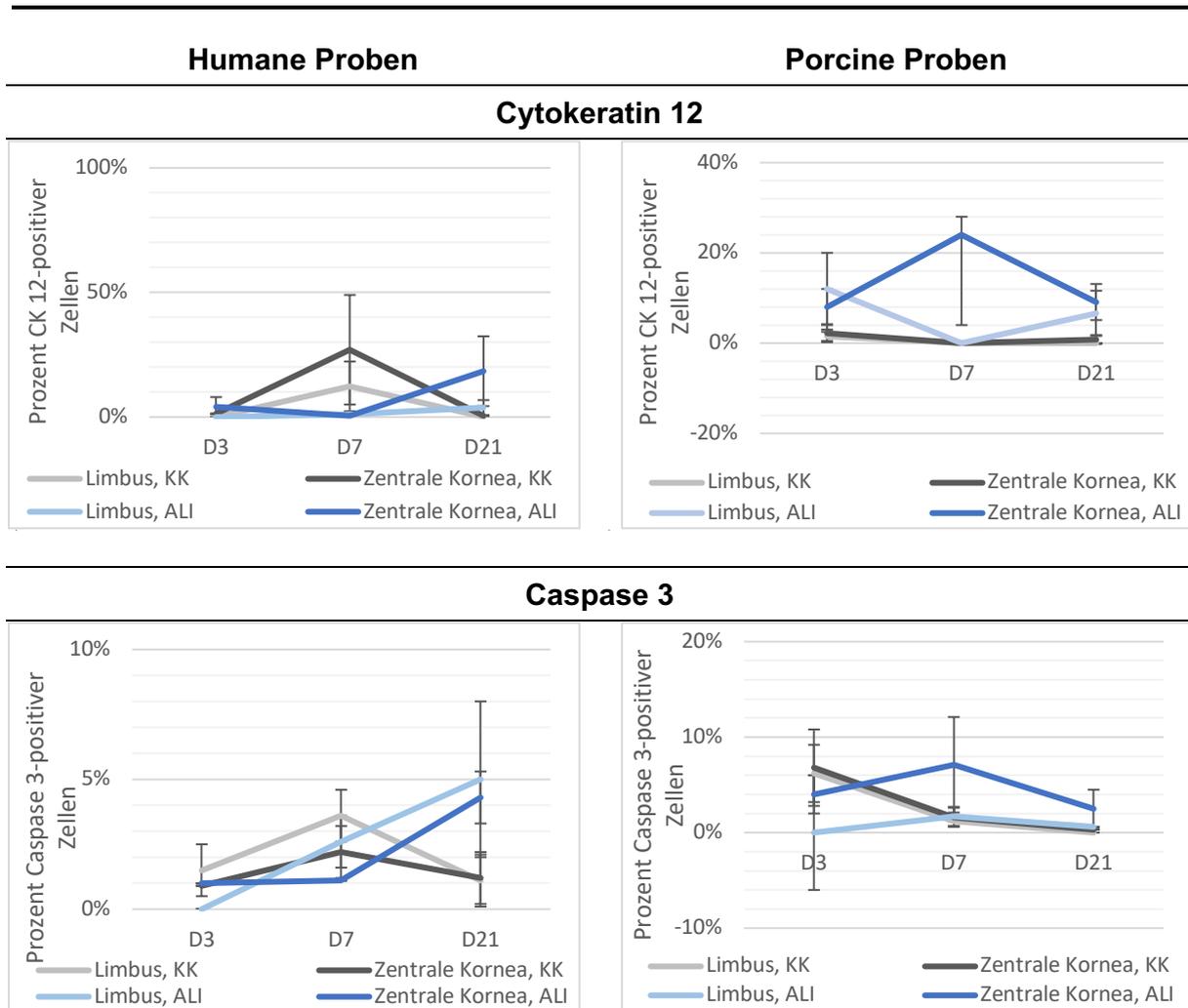


Abb. 11: Dargestellt sind die prozentualen Anteile (\pm SD) der antikörper-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl nach Re-Epithelialisierung auf dezellularisierter humaner oder porciner Kornea und Kultivierung für 3, 7 oder 21 Tage. Untersucht wurden ABCG2, p63 α , Cytokeratin 3, 12 und 15, Ki67 und Caspase 3. Aufgetragen sind die prozentualen Anteile im Verlauf von Tag 3, 7 und 21 in konventioneller Kultivierung (KK) und in einer Luft-Flüssigkeits-Grenze (*air liquid interface*, ALI), aufgeteilt in Limbus und zentrale Kornea. Datenerhebung mittels Fluoreszenzfärbungen.

Um zu überprüfen, welche Faktoren einen Einfluss auf die Expression der Proteine und somit den Erhalt der Stammzeleigenschaften ausüben, wurde jeweils eine multiple Regression pro Protein durchgeführt. Die antikörper-positiven Zellen dienten als abhängige Variable (Kap. 2.2.5.2), die Variablen Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation wurden als unabhängige Variablen getestet (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$\begin{aligned} \text{Antikörper-positiv Zellen} = & \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsart} \\ & + \beta_3 \times \text{Kultivierungsdauer} + \beta_4 \times \text{Lokalisation} \end{aligned}$$

Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang (Kap. 6.4). Einen signifikanten Einfluss übte die Kultivierungsdauer auf die Expression von Ki67 aus. Je länger die Korneae

kultiviert wurden, desto weniger Ki67-positive Zellen wurden detektiert ($\beta_{\text{Kultivierungsdauer}} = -,155$, $p_{\text{Kultivierungsdauer}} < ,001$). Auf die Expression der Progenitorzell- und Epithelzellproteine hat sie sich nicht signifikant ausgeübt. CK 3 wurde signifikant weniger von Zellen aus einer porcinen Probe exprimiert als von Zellen aus einer humanen Probe ($\beta_{\text{Spezies}} = -,159$, $p_{\text{Spezies}} = ,002$).

Um die Erhaltung der Stammzeleigenschaften besser zu quantifizieren, wurde die Expression der Progenitorzellmarker über einen Zeitraum von drei Wochen untersucht. Dafür wurden Mittelwertvergleiche zwischen der Expression der Marker an Tag 3 und an Tag 21 angefertigt (Anhang, Kap. 6.5). Eine gleichbleibende Expressionsstärke der Progenitorzellmarker ABCG2, p63 α und CK 15 über drei Wochen wurde detektiert. Auch bei isolierter Betrachtung des Limbus fand eine Detektion dieser Marker an Tag 21 in gleicher Stärke wie an Tag 3 statt (Anhang, Kap. 6.5). So war in den humanen Proben der durchschnittliche Anteil der antikörper-positiven Zellen an Tag 21 im Limbus für ABCG2 71% \pm 14%, für p63 α 10% \pm 8% und für CK 15 49,5% \pm 16% (Tab. 6). Für die porcinen Proben lag der Anteil für ABCG2 bei 81% \pm 5%, für p63 α bei 29,2% \pm 15% und für CK 15 bei 28,5% \pm 15% (Tab. 6). Die Expressionsstärke für die Epithelzellmarker CK 3 und 12 blieb über einen Zeitraum von drei Wochen gleich (Anhang, Kap. 6.5 und Tab. 6). An Tag 21 betrug der durchschnittliche Anteil der antikörper-positiven Zellen im Limbus für CK 3 23,8% \pm 13% (humane Proben) beziehungsweise 1,9% \pm 2% (porcine Proben) und für CK12 2% \pm 2% (humane Proben) und 3,3% \pm 3% (porcine Proben) (Tab. 6). Ebenfalls wurde kein Anstieg der Expression des apoptotischen Markers Caspase 3 über drei Wochen detektiert (Anhang, Kap. 6.5 und Tab. 6). In der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 zeigte sich in den humanen Proben eine unveränderte Expressionsstärke über drei Wochen (Anhang, Kap. 6.5 und Tab. 6). In den porcinen Proben hingegen kam es im Limbus und auf der zentralen Kornea zu einem signifikanten Abfall der Expression an Tag 21 im Vergleich zu Tag 3 (Limbus: $t(9) = 3,292$, $p = ,009$; Zentrale Kornea: $t(9) = 3,379$, $p = ,008$). Dies entspricht im Limbus einem Abfall von 89,48% und in der zentralen Kornea von 86,72%. Die auf den Erhalt der Stammzeleigenschaften bezogene Aussage der These 1 wird verifiziert, da die Stammzeleigenschaften der LESC durch die Kultivierung auf dezellularisiertem humanen oder porcinen Limbus erhalten bleiben und eine Ausdifferenzierung zu Epithelzellen verhindert werden konnte.

Ergebnisse

Tabelle 6: Mittelwerte der antikörper-positiven Zellen im Limbus im Zeitverlauf

		D3	D7	D21
ABCG2	Human	60,6% ± 15%	78,6% ± 11%	71% ± 14%
	Porcin	58,2% ± 15%	64% ± 17%	81% ± 5%
p63α	Human	19,3% ± 10%	10,7% ± 6%	10% ± 8%
	Porcin	17,4% ± 9%	10% ± 9%	29,2% ± 15%
Cytokeratin 15	Human	35,6% ± 13%	48,9% ± 16%	49,5% ± 16%
	Porcin	33,7% ± 15%	11,9% ± 10%	28,5% ± 15%
Ki67	Human	32,6% ± 12%	52,3% ± 13%	24,3% ± 15%
	Porcin	60,3% ± 16%	50,4% ± 10%	7,2% ± 5%
Cytokeratin 12	Human	0%	6,7% ± 6%	2% ± 2%
	Porcin	5,7% ± 4%	0%	3,3% ± 3%
Cytokeratin 3	Human	5,2% ± 5%	24,6% ± 10%	23,8% ± 13%
	Porcin	0,6% ± 1%	4,9% ± 5%	1,9% ± 2%
Caspase 3	Human	0,7% ± 1%	3,1% ± 1%	3,1% ± 2%
	Porcin	7,4% ± 3%	1,5% ± 1%	0,4% ± 0%

Dargestellt als Mittelwerte ± Standardabweichung sind die prozentualen Anteile der antikörper-positiven Zellen an der Gesamtzahl der Zellen, die sich in einem dezellularisierten humanen oder porcinen Limbus befinden. Untersucht wurden die Tage 3, 7 und 21. Datenerhebung mittels immunhistochemischer Färbungen.

Um einen Unterschied zwischen dem dezellularisierten Limbus und der dezellularisierten zentralen Kornea bezüglich des Stammzellerhalts zu analysieren, wurde die Expression der Proteine an Tag 7 und 21 zwischen beiden Lokalisationen verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Progenitorzell- sowie Epithelzellmarker nachgewiesen werden (Anhang, Kap. 6.5). Ebenfalls konnte ein Erhalt der Stammzelleigenschaften auf der zentralen Kornea durch einen fehlenden Abfall der Progenitorzellmarker sowie einen fehlenden Anstieg der Epithelzellmarker über drei Wochen nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Ergebnisse aus der oben aufgeführten Regression, die keinen Einfluss der Lokalisation auf die Proteinexpression detektieren (Anhang, Kap. 6.4). Der dezellularisierte Limbus erhielt die Stammzelleigenschaften vergleichbar mit der zentralen Kornea.

These 4 befasst sich mit der Frage, ob die Kultivierungsart einen Unterschied im Erhalt der Stammzeleigenschaften bedingt. Es wurden Mittelwertvergleiche angefertigt, die die Proteinexpressionen abhängig von der Kultivierungsart miteinander verglichen. Dabei wurden die humanen und die porcinen Proben getrennt voneinander betrachtet (Anhang, Kap. 6.5). Es wurde festgestellt, dass sich die Zellen aus den beiden Kultivierungsarten in Bezug auf die Proteinexpressionen vergleichbar verhielten.

Die Kultivierungsarten zeigten bei Ki67 in beiden Proben unterschiedliche Einflüsse. Während in der porcinen Probe die Expressionsstärke sowohl an Tag 7 als auch an Tag 21 unter beiden Kultivierungsbedingungen gleich hoch war, zeigte sich in den humanen Proben an Tag 21 eine stärkere Expression von Ki67 von Zellen aus einem ALI (D21, human: $t(10) = -2,348$, $p = ,041$). Somit bewirkte ein ALI bei LESC gewachsen auf einer dezellulierten humanen Kornea einen positiven Effekt auf das Proliferationspotential. Auf die Expression von Caspase 3 waren die Einflüsse der beiden Kultivierungsarten miteinander vergleichbar. An Tag 21 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen gefunden werden (human: $t(10) = -,635$, $p = ,540$; porcine: $t(10) = -1,716$, $p = ,117$). Auch ist der in Abbildung 10 zu vermutende Anstieg von Caspase 3 zwischen Tag 7 und Tag 21 in der humanen Probe aus einem ALI statistisch nicht nachweisbar (D7 → D21: $t(19) = -1,245$, $p = ,245$). Der Progenitorzellmarker CK 15 wurde abhängig von der Kultivierungsart nicht signifikant unterschiedlich exprimiert. Seine Expression war an den Tagen 7 und 21 bei beiden Spezies in beiden Kultivierungsarten gleich stark (Anhang, Kap. 6.5). Auch bei den Progenitorzellmarkern ABCG2 und p63 α hatte die Kultivierungsart keinen Einfluss auf deren Expression in den humanen Proben. Bei den porcinen Proben hingegen zeigte sich an Tag 7 eine gesteigerte Expression von ABCG2 bei LESC aus einem ALI im Vergleich zu der konventionellen Kultivierung (ABCG2, D7: $t(10) = -2,693$, $p = ,023$). An Tag 21 wurde ein Unterschied des Markers p63 α ebenfalls in den porcinen Proben festgestellt. Hier war eine gesteigerte Expression bei den Proben aus einem ALI verglichen mit einer konventionellen Kultivierung festzustellen (p63 α , D21: $t(10) = -2,570$, $p = ,011$). Auch die Epithelzellmarker CK 3 und 12 wurden von der Kultivierungsart unterschiedlich beeinflusst. Dabei wies CK 12 keine Beeinflussung in der Expression durch unterschiedliche Kultivierungsarten auf. Die Expressionsstärke war in beiden Proben zwischen den Kultivierungsarten über 21 Tage miteinander vergleichbar. CK 3 hingegen wurde in der humanen Probe an Tag 21 signifikant mehr exprimiert, wenn die Zellen unter ALI-Bedingungen kultiviert wurden ($t(10) = -2,797$, $p = ,019$). Bei der porcinen Probe zeigten sich hier hingegen keine Unterschiede ($t(10) = -1,146$, $p = ,279$). Die oben aufgeführte Regression wies der Kultivierungsart keinen signifikanten Einfluss in der Expression der Progenitor- und

Epithelzellmarker zu. Somit kann These 4 nicht vollständig angenommen werden. Jedoch konnte in Gesamtschau mit den Ergebnissen der Mittelwertvergleiche gezeigt werden, dass eine Kultivierung von LESC auf einer dezellularisierten porcinen Kornea in ALI eher zu einem Erhalt der Progenitoreigenschaften führt durch eine höhere Expression von ABCG2 und p63 α . In den humanen Proben stellten sich keine Unterschiede in den Progenitoreigenschaften dar, jedoch wurde eine vermehrte Expression des Epithelzellmarkers CK 3 unter ALI detektiert.

Als nächster Schritt wurden der dezellularisierte humane und porcine Limbus in Bezug auf den Erhalt der Stammzell- und Proliferationseigenschaften von *ex-vivo* kultivierten humanen LESC verglichen (zweite Aussage der These 2). Es konnten keine Unterschiede zwischen dem humanen und porcinen Limbus in der Anzahl der positiv gefärbten Zellen in Bezug auf die Progenitorzeleigenschaften, die Proliferation oder die Apoptose mittels Regression detektiert werden (Anhang, Kap. 6.4). Um dies weiter zu untersuchen, wurde die Anzahl der positiv gefärbten Zellen im humanen Limbus und im porcinen Limbus an den Tagen 7 und 21 miteinander verglichen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden (Anhang, Kap. 6.5). Der Erhalt der Stammzeleigenschaften ist auf dezellularisiertem porcinen Limbus vergleichbar gut wie auf dezellularisiertem humanen Limbus (Verifizierung der zweiten Aussage der These 2). Es konnte kein Unterschied in der Expression von Ki67 und Caspase 3 zwischen beiden Proben festgestellt werden. Der Erhalt der Proliferationsfähigkeit wird in Kapitel 3.5 tiefergehend untersucht.

In dem Experiment konnte im Ergebnis nachgewiesen werden, dass der humane und porcine dezellularisierte Limbus gleichermaßen die Stammzeleigenschaften über einen Zeitraum von drei Wochen erhalten und dies vergleichbar mit der dezellularisierten zentralen Kornea tun. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen Limbus und zentraler Kornea in Bezug auf die Eigenschaften der LESC. Es wurde ein positiver Effekt des ALI bei porcinen Proben durch vermehrte Expression der Progenitormarker ABCG2 und p63 α detektiert. Gleichzeitig wurden in den humanen Proben CK3 an Tag 7 und Ki67 an Tag 21 vermehrt exprimiert.

3.4.2 quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

In These 3 wurde die Vermutung aufgestellt, dass die Stammzell- und Proliferationseigenschaften durch Expansion auf dezellularisiertem Gewebe besser als auf Kunststoff einer Multi-Well-Platte erhalten werden. Zur Überprüfung dieser Annahmen wurden die Expression der Progenitorzellmarker mittels qrt-PCR untersucht. Verglichen wurden die

Expressionen von sechs Markern (die Progenitorzellmarker ABCG2, p63 α -1, p63 α -2 und CK 15, der anti-apoptotische Marker Bcl-2 und der pro-apoptotische Marker Bax) in LESC nach Wachstum auf einer humanen oder porcinen dezellularisierten Kornea mit LESC nach Wachstum auf dem Kunststoff einer herkömmlichen Multi-Well-Platte (folgend: Kontrolle).

Um die Einflüsse der Faktoren Spezies und Kultivierungsdauer auf den Erhalt der Stammzelleigenschaften quantifizieren zu können, wurde eine multiple Regression für jedes Gen durchgeführt. Die abhängige Variable war der C_T-Wert der Proben (Kap. 2.2.5.2), die unabhängigen Variablen waren Spezies und Kultivierungsdauer (Kap. 2.2.5.1). Folgendes Modell wurde verwendet:

$$C_T\text{-Wert} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsdauer}$$

Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang (Kap. 6.6). Bis auf p63 α wurde jedes Gen von der Kultivierungsdauer signifikant beeinflusst. Je länger die Zellen auf den Proben oder der Kontrolle kultiviert wurden, desto weniger Ziel-DNA war vorhanden. Der als nicht signifikant nachgewiesene Einfluss der Spezies zeigt, dass die humane dezellularisierte Kornea zum einen vergleichbar mit der porcinen Kornea ist, zum anderen sich beide nicht von der Kontrolle als Wachstumsuntergrund bezüglich des Erhalts der Stammzelleigenschaften unterscheiden.

Um das Ergebnis der Regression tiefergehend zu untersuchen, wurden die Expressionen der Gene zwischen Proben und Kontrolle in ein Verhältnis gesetzt (Kap. 2.2.4.2). Diese relativen Expressionsunterschiede wurden in Abbildung 12 im zeitlichen Verlauf aufgetragen, dabei wurden die Zeitpunkte Tag 3, 7 und 21 untersucht. Pro Diagramm ist der relative Expressionsunterschied eines Gens zwischen der porcinen sowie der humanen Probe mit der Kontrolle dargestellt.

Relative Gen-Expressionsunterschiede von Stammzellen gewachsen auf dezellularisierter Kornea oder Kunststoff

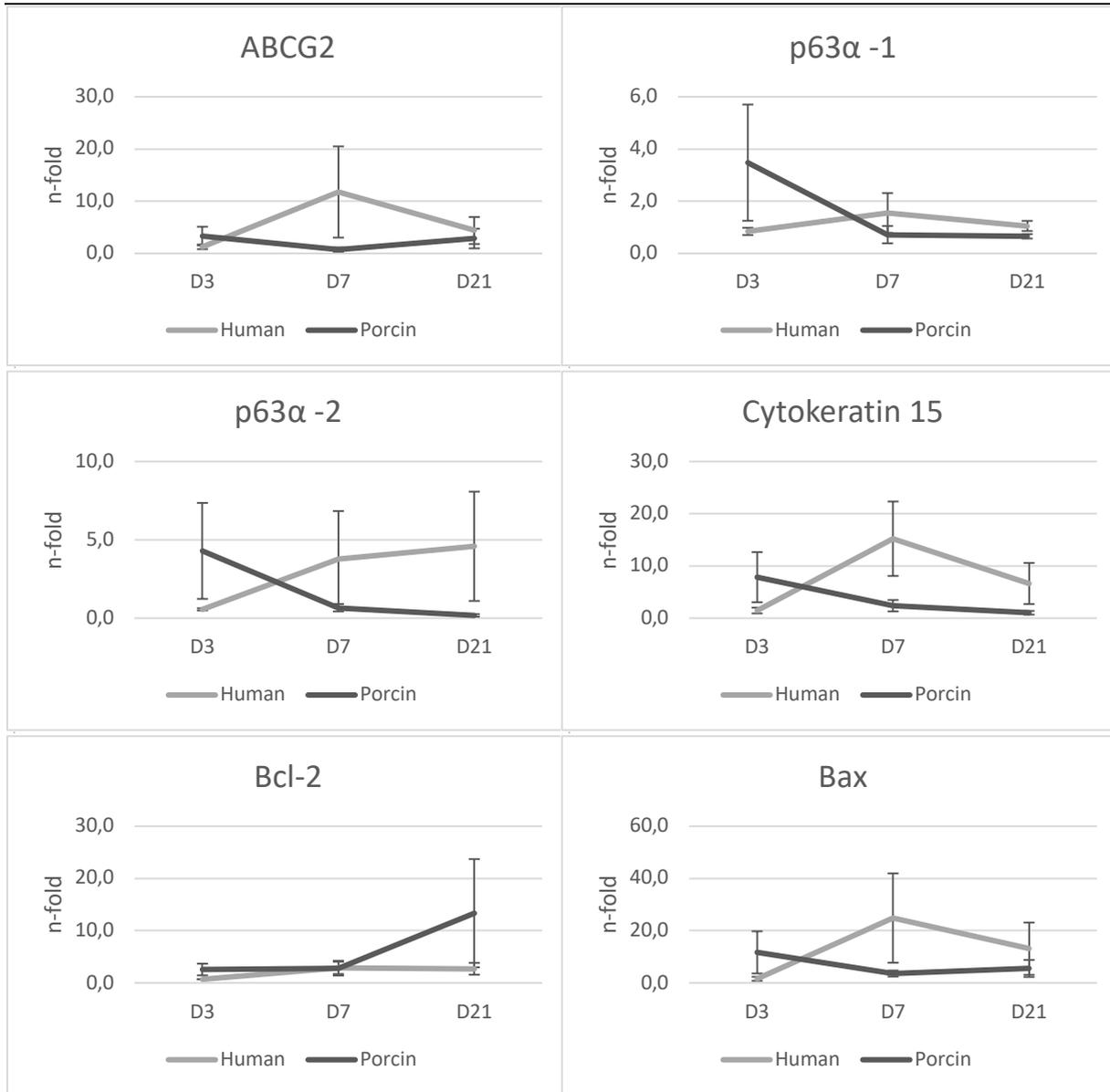


Abb. 12: Dargestellt sind die relativen Expressionsunterschieden der Gene ABCG2, p63α-1, p63α-2, Cytokeratin 15, Bcl-2 und Bax zwischen limbalen epithelialen Stammzellen gewachsen auf dezellularisierter humaner oder porciner Kornea und gewachsen auf Kunststoff einer herkömmlichen Zellkulturschale. Aufgetragen sind diese als Mittelwerte (\pm SD) im Verlauf von Tag 3, Tag 7 und Tag 21 einer humanen und einer porcinen Probe. Datenerhebung mittels quantitativer Echtzeit-PCR.

In Abbildung 12 sind Trends zu erkennen, eine Signifikanztestung mittels t-Test hingegen ergab keine eindeutige Signifikanz bei der Untersuchung der Expressionsunterschiede zwischen Proben und Kontrolle (Anhang, Kap. 6.7). Diese Tendenzen werden dennoch folgend dargestellt. Die humane und die porcine Probe scheinen gegensätzliche Einflüsse auf die Expression der Zielgene auszuüben. Es zeigt sich eine Tendenz dahingehend, dass bei der humanen Probe an Tag 7 eine deutliche relativ erhöhte Expression aller Gene gegenüber der Kontrolle besteht. An Tag 21 sinkt diese stark erhöhte Expression auf ein

niedrigeres Niveau, besteht aber weiterhin. Besonders ist dies bei den Progenitorzellmarkern ABCG2 (D7: $11,8 \pm 15,1 \rightarrow$ D21: $4,4 \pm 4,5$), p63 α -2 (D7: $3,8 \pm 5,3 \rightarrow$ D21: $4,6 \pm 6$), und CK 15 (D7: $15,2 \pm 12,4 \rightarrow$ D21: $6,6 \pm 6,8$) zu erkennen. Aber auch der anti-apoptische Marker Bax wird ab Tag 7 deutlich mehr von der humanen Probe exprimiert als von der Kontrolle (D7: $24,9 \pm 29,6 \rightarrow$ D21: $13,1 \pm 17,4$). In der porcinen Probe hingegen gibt es eine erhöhte Expression der Gene gegenüber der Kontrolle bis Tag 21, welche ab Tag 7 nur noch minimal zu detektieren ist. Eine Ausnahme stellt hier der anti-apoptische Marker Bcl-2 dar, der an Tag 21 eine gesteigerte Expression in der Probe aufweist (D21: $13,3 \pm 17,9$).

Ein Unterschied im Stammzellerhalt von LESC durch eine Kultivierung auf einem dezellularen Limbus im Vergleich mit einer 2D-Zellkulturschale konnte nicht nachgewiesen werden, somit wird die erste Aussage der These 3 falsifiziert. Allerdings zeigte sich die Tendenz, dass es eine relativ erhöhte Expression aller Gene bei der humanen und porcinen Probe gegenüber der Kontrolle gibt.

3.5 Proliferationseinfluss durch die Trägermatrix - Vergleich zwischen dezellularen Korneae und Kunststoff

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich das Proliferationsverhalten von LESC auf dezellularem Gewebe in einem Zeitraum von drei Wochen verändert. Dies wurde verglichen mit dem Proliferationsverhalten von LESC gewachsen auf einer herkömmlichen 2D-Multi-Well-Platte (These 3). Ein WST-1-Proliferationsassay diente der Datenerhebung (Kap. 2.2.2.5).

In Abbildung 13 wird das Proliferationsverhalten von LESC, ausgesät auf humaner oder porciner dezellularisierter Kornea oder auf dem Kunststoff einer Multi-Well-Platte (im Folgenden: Kontrolle) dargestellt. Aufgetragen auf die Untersuchungszeitpunkte Tag 3, 7 und 21 ergeben sich hierbei relative Wachstumskurven.

Relative Wachstumskurven von LESC gemessen im WST-1-Proliferationsassay über 21 Tage

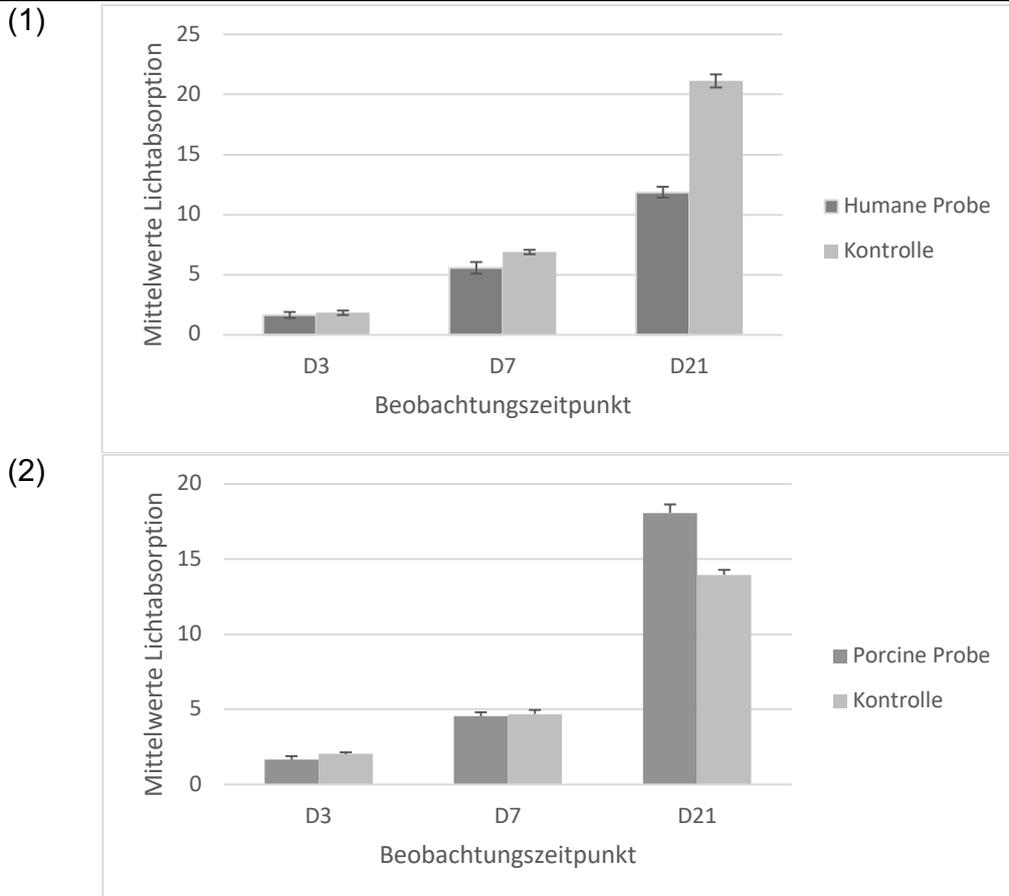


Abb. 13: Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem WST-1-Proliferationsassay. Die gemessene Lichtabsorption verläuft proportional zur Anzahl proliferierender Zellen. Zu sehen sind die Mittelwerte (\pm SD) der Lichtabsorption normiert auf D0 (y-Achse) von limbalen epithelialen Stammzellen, ausgesät auf humane dezellularisierte Korneae (1) oder porcine dezellularisierte Korneae (2) im Vergleich mit auf Kunststoff ausgesäten LESC. Sie sind aufgetragen entlang der Zeitpunkte Tag 3, 7 und 21 und sind als relative Wachstumskurven zu interpretieren.

Mittels Mittelwertvergleich konnte signifikant nachgewiesen werden, dass die LESC der humanen sowie der porcinen Probe bis Tag 21 steigend proliferieren (D3 \rightarrow D21: Human: $t(4) = -2,797$, $p = ,049$; Porcin: $t(4) = -6,323$, $p = ,003$). Auch die LESC der Kontrolle steigern ihr Proliferationspotential bis Tag 21 ($t(10) = -5,239$, $p = ,002$).

Um diesen Effekt greifbarer zu machen, wurde eine multiple Regression durchgeführt. Als abhängige Variable wurde die gemessene Lichtabsorption verwendet (Kap. 2.2.5.2), als unabhängige Variablen dienten Spezies und Kultivierungsdauer (Kap. 2.2.5.1). Das folgende Modell wurde angewendet:

$$\text{Lichtabsorption} = \beta_1 \times \text{Spezies} + \beta_2 \times \text{Kultivierungsdauer}$$

Hieraus ergab sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Kultivierungsdauer auf das Proliferationsverhalten ($\beta_{(\text{Kultivierungsdauer})} = 7,186$, $p_{(\text{Kultivierungsdauer})} < ,001$). Das positive β beschreibt hierbei den Effekt, dass die Lichtabsorption stärker und damit die Anzahl der vitalen Zellen höher wurde, je länger die re-epithelialisierten Korneae kultiviert wurden. Einen Einfluss der Spezies des Wachstumsuntergrunds auf die Proliferation der LESC konnte nicht nachgewiesen werden ($\beta_{(\text{Spezies})} = ,985$, $p_{(\text{Spezies})} = ,293$). Diese Aussage stützend, zeigte ein Mittelwertvergleich keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten zwischen den Proben untereinander und im Vergleich mit der Kontrolle an Tag 7 und Tag 21 (Anhang, Kap. 6.8). Dennoch ist an Abbildung 12 die Tendenz zu erkennen, dass an Tag 21 die LESC der porcinen Probe ein stärkeres Wachstumspotential aufweisen als die Kontrolle. Gegensätzlich dazu haben die Zellen der humanen Probe an Tag 21 weniger stark proliferiert als die Kontrolle. Für beide Beobachtungen wurde keine Signifikanz gefunden (Porcin: $t(4) = ,907$, $p = ,416$; Human: $t(4) = -1,7$, $p = ,164$).

Durch diese Ergebnisse kann These 1 erneut verifiziert werden. Durch das stetige Proliferationspotential sowohl in der humanen als auch in der porcinen Probe ist bewiesen, dass humane LESC auf dezellularisiertem kornealen Gewebe kultiviert werden können. Ebenfalls wurde aufgezeigt, dass die dezellularisierte humane und porcine Kornea das Proliferationsverhalten von LESC nach Re-Besiedelung erhalten. Beide Wachstumsuntergründe zeigen hier vergleichbar gute Ergebnisse. Diese Aussage wird gestützt von der Untersuchung des Proliferationsgens Ki67 (Kap. 3.4.1), welches zwischen beiden Proben in gleicher Stärke über drei Wochen nachgewiesen wurde. These 3 wurde falsifiziert, da die dezellularisierte Matrix das Proliferationsverhalten von LESC nach Re-Epithelialisierung nicht besser erhält als der Kunststoff einer konventionellen 2D-Multi-Well-Platte.

4 Diskussion

Erkrankungen der Hornhaut stellen die vierthäufigste Ursache für Erblindung im Erwachsenenalter dar [112]. Die bilaterale LSCD führt durch die fehlende Regenerationsfähigkeit des kornealen Epithels zu Erosionen und Ulzerationen der Kornea und zur Überwachsung mit Bindehautepithel. Dies kann schließlich über eine Verminderung der Hornhauttransparenz zu einer Erblindung führen. Die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt und umfassen unter anderem die Möglichkeit der Transplantation *ex-vivo* kultivierter und auf eine Trägermatrix übertragener LESC [9, 52]. Die aktuell genutzten Trägermatrices weisen jedoch einige Nachteile im Hinblick auf die Expansion und Transplantation von LESC auf [9]. Durch den Anschluss an das limbale Gefäßsystem des Wirtes kann das allogene Gewebe eine Immunreaktion auslösen und so zu einer Transplantatabstoßung führen [2, 5]. Es besteht hier die Notwendigkeit einer lebenslangen medikamentösen Immunsuppression des Patienten mit negativem Einfluss auf weitere Organsysteme wie beispielsweise die Nieren [78].

Für eine *ex-vivo* Expansion von LESC wird aktuell am häufigsten die AM als Wachstumsunterlage verwendet [41]. Durch ihr kollagenreiches Gerüst eignet sie sich gut für das *Tissue Engineering* und sie besitzt eine geeignete EZM mit entzündungshemmenden Eigenschaften. Allerdings weist die AM mehrere Nachteile auf, die in Kapitel 1 bereits erörtert wurden. Eine physiologische Regulation der Stammzellen ist aufgrund der fehlenden limbus-spezifischen EZM und deren individuellen Drei-Dimensionalität nur bedingt vorhanden, weshalb es langfristig zu einer Ausdifferenzierung der Stammzellen kommt [55, 113]. Die Zellen verlieren ihre Regenerationsfähigkeit und es kann zu einer erneuten LSCD kommen. Die AM ist ein opakes Gewebe mit relativ geringer Zugfestigkeit, weswegen es zu Nachteilen bei der Wiederherstellung des Visus und dem Standhalten mechanischer Belastung kommen kann. Zusätzlich besteht das Risiko der Übertragung von Infektionen, da es sich bei der AM um Spendermaterial handelt [114, 115]. Der Erfolg der Therapie mittels AM unterliegt großen Schwankungen mit einer Erfolgsrate zwischen 50 und 83% [50, 59, 62, 63]. Daher kommt der Etablierung alternativer Trägermatrices, die von diesen Nachteilen nicht betroffen sind, eine hohe Bedeutung zu. Zu diesen Alternativen gehören beispielsweise Kollagene [116] (Hydrogele, vernetzt oder komprimiert), Fibrin [64] oder Siloxanhydrogel-Kontaktlinsen [115, 117]. Diese künstlich konstruierten Gewebe haben den Nachteil, dass sie kosten- und zeitintensiv aufgearbeitet und drei-dimensional konstruiert werden müssen, um den LESC einen geeigneten Wachstumsuntergrund zu bieten [118-120]. Weiterhin besitzen sie eine im Vergleich zu nativem Gewebe verminderte

Biokompatibilität. Ebenfalls zeigen sich Defizite im Erhalt der Stammzeleigenschaften oder Einschränkungen im Zellwachstum durch zytotoxische Substanzen [59].

Folgend ist es wichtig, neue Wachstumsuntergründe für LESC zu entwickeln, welche eine erfolgreiche Wiederherstellung der physiologischen Nische und somit den langfristigen Erhalt der Stammzellen ermöglichen. Spaniol et al. haben in Vorarbeiten den Erhalt der Grundstruktur des humanen Limbus nach einer Dezellularisierung untersucht [77]. Es konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Dezellularisierung die zugrundeliegende anatomische Struktur nicht verändert und dass von der Dezellularisierung keine Zellzytotoxizität ausgeht. In der vorliegenden Arbeit, welche direkt an die Vorarbeiten von Spaniol et al. anknüpft, wurden erstmalig der dezellularisierte humane und auch porcine Limbus mit humanen LESC re-besiedelt und diese anschließend weitergehend untersucht.

4.1 Die Verwendung von dezellularisiertem Gewebe

In der aktuellen Forschung wird der regenerativen Medizin und dem *Tissue Engineering* ein steigender Stellenwert zugeschrieben. *Tissue Engineering* ist dabei die künstliche Herstellung biologischer Gewebe, die für den Einsatz und Ersatz im menschlichen Körper verwendet werden. Das Gebiet der künstlichen Gewebeherstellung ist hierbei breit gefächert, teilt sich aber in zwei große Hauptbereiche. Um neues Gewebe zu züchten, werden entweder Gerüste auf Basis von Biopolymeren verwendet oder natives Gewebe aus verschiedenen Quellen. Auch im Forschungsbereich der Hornhauterkrankungen wird *Tissue Engineering* genutzt, um die Augenoberfläche zu rekonstruieren. Dabei müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden, um als geeignetes Material in Frage zu kommen. Um eine Transplantation des Gerüsts in den Patienten zu ermöglichen, muss die chirurgische Handhabung durch eine mechanische Stabilität gesichert sein. Dabei sollte das Material flexibel genug sein, um der konstanten Scherkraft durch den Blinzelreflex standzuhalten. Als wichtigstes Kriterium gilt jedoch die uneingeschränkte Transparenz des Gerüsts, die zusammen mit der geeigneten Form die Transmission und Lichtbrechung im Auge bedingen [121].

Als vielversprechende Optionen haben sich dabei unter anderem die Verwendung von dezellularisiertem Gewebe und der zellbasierte Ansatz herausgestellt. Der zellbasierte Ansatz beruht dabei auf der Bildung einer Kollagen-Matrix durch humane stromale Hornhautzellen. Diese werden durch die Gabe von Vitamin C zu einer verstärkten Synthese der eigenen extrazellulären Matrixbestandteile angeregt und bilden somit das 3D-Gerüst. Vorteile liegen hierbei in der natürlichen Zusammensetzung, die den physiologischen

Gegebenheiten der Kornea sehr nahe kommen [122]. Bereits aus einer kleinen Gewebeprobe kann eine hohe Anzahl humaner Hornhautzellen gewonnen werden. Somit würde nahezu keine Einschränkung in der Verfügbarkeit bestehen. Hier stellt sich jedoch die lange Wachstumsdauer von bis zu 12 Monaten bis zum Erreichen einer nutzbaren Dicke der Matrices als problematisch heraus. Daher ist hier weitere Forschung notwendig.

Bei der Verwendung von dezellularisiertem Gewebe werden die meisten biologischen, mechanischen und immunogenen Anforderungen erfüllt, weswegen diesem Ansatz ein hohes Interesse entgegen gebracht wird [123, 124]. Unter Entfernung der zellulären Bestandteile mittels physikalischer, chemischer und biochemischer Methoden wird ein Material mit erhaltener EZM gewonnen. Dieses kann anschließend als biologisches Gerüst für die Generierung von künstlichen Organen oder dem *ex-vivo* Wachstum von Zellen dienen [125]. Dieses Gerüst bietet eine nahezu perfekte 3D-Form für die organspezifischen Zellen. Es liegt eine hohe Biokompatibilität vor und die Immunreaktion des Wirts wird durch das Fehlen von Zellen und damit von genetischem Material überwunden. Dezellularisiertes Gewebe hat daher schon in vielen verschiedenen Fachbereichen Anwendung gefunden. Klinische Anwendungen gibt es bereits in der Transplantation von dezellulierten humanen Herzklappen, welche zu einer geringeren Anzahl von Re-Operationen führen und somit den zuvor genutzten Herzklappen deutliche überlegen sind [126]. Zusätzlich gibt es viele präklinische und klinische Studien, die vielversprechend auf den Einsatz von dezellularisiertem Gewebe als Ersatz für beispielsweise defekte Knochen, Muskeln, Haut oder Herzgewebe hoffen lassen [127]. Vorteile von dezellularisiertem Gewebe liegen in der standardisierten Produktion und der Aufbereitung von Gewebe, welches ansonsten verworfen wird. Als potentielle Quelle für dezellulierten Hornhautersatz können beispielsweise humane, kadaverne Spenderhornhäute verwendet werden, welche sich aus Qualitätsgründen, wie beispielsweise eine zu geringe Endothelzellzahl, nicht für eine Transplantation eignen [128]. Durch die Elimination der Zellen und somit der kritischen Antigene werden Entzündungsreaktionen und immunologische Abstoßungsreaktionen des Wirts nahezu verhindert [129, 130]. Dies ist ein wichtiger Punkt, um den langfristigen Erfolg einer Therapie zu gewährleisten. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass nach einer Dezellularisierung die für die Regulation der Zellen wichtigen Komponenten wie Wachstumsfaktoren, Kollagentypen oder Glykosaminoglykane in dem Gewebe erhalten bleiben [131]. Dies sind Faktoren, um das *Mechanosensing* von Zellen zu steuern. *Mechanosensing* ist die Fähigkeit einer Zelle, auf mechanische Hinweise ihrer Mikroumgebung zu reagieren. Dabei reagiert sie unter anderem auf Spannung, Substratsteifigkeit und Topologie ihrer Umgebung mit Differenzierung, Apoptose, Proliferation oder Migration [132]. Eine

dezellularisierte Matrix mit erhaltener EZM kann somit das *Mechanosensing* der Zellen auf physiologische Weise beeinflussen.

Es liegen bereits viele vielversprechende Daten für die Nutzung von dezellularisierten humanen Matrices aus *in vitro* Forschungen vor. Ziel ist es dabei, eine dezellularisierte allogene EZM zu generieren, welche dann durch autologe Zellen oder Stammzellen re-zellulärisiert wird. So können patienten-individuelle klinische Ansätze entwickelt werden. Es wurden schon viele menschliche Gewebe und Organe dezellularisiert und für das *Tissue Engineering* verwendet, zum Beispiel Knorpel und Knochen, Fettgewebe, Herz, Lunge, Leber, Niere und ebenso die Hornhaut [91]. Die meisten dieser Gewebe wurden bislang *in vitro* getestet und zeigten positive Ergebnisse in Bezug auf Re-Besiedelung mit verschiedenen Zelltypen, Biokompatibilität und der Immunogenfreiheit [91]. Die zukünftige Herausforderung liegt nun in der Entwicklung von transplantierfähigem dezellularisiertem Material, welches alle notwendigen strukturellen und funktionellen Aspekte des zu ersetzenden Organs aufweist.

Die Möglichkeit xenogener Transplantationen gewinnt immer mehr an Wichtigkeit. Porcines Material als Ursprung für Transplantationen in den menschlichen Körper bildet einen wachsenden Forschungsschwerpunkt. Darüber hinaus kommen bereits xenogene Zellen oder Gewebe wie beispielsweise porcine oder bovine Herzklappen regelmäßig in der Klinik zum Einsatz [133]. Vorteile des porcinen Materials ergeben sich vor allem durch die hohe Verfügbarkeit dieser Organe und der genetischen Ähnlichkeit zum humanen Gewebe. Wegen der hohen Verfügbarkeit können selbst Patienten, die momentan nicht den Kriterien der Warteliste für Spenderorgane entsprechen, eine Transplantation erhalten. Bei der Transplantation von humanem Gewebe darf eine vorgeschriebene Ischämiezeit des Organs nicht überschritten werden, um das Spenderorgan nicht unbrauchbar zu machen. Wird beispielsweise bei einer Spenderlunge der passende Empfänger gefunden, findet die Transplantation unverzüglich und vorher oft nicht absehbar statt. Bei der Verwendung von xenogenem Gewebe kann der Operationszeitpunkt exakt geplant werden, da die Verfügbarkeit von der Schlachtung des Tiers abhängig ist und diese auf den Operationszeitpunkt abgestimmt werden kann. Ebenfalls kann sichergestellt werden, dass nur gesunde und junge Organe transplantiert werden würden [134]. Schwierigkeiten finden sich in der phylogenetischen Distanz zwischen Schwein und Mensch. Ein großes Problem findet sich hierbei in hyperakuten Abstoßungsreaktionen von vaskularisierten Geweben, welche durch humane Antikörper gegen porcine Antigene ausgelöst werden. Dabei richten sich ungefähr 1% aller zirkulierender Antikörper gegen das xenogene terminale Kohlenhydrat-Epitop Gal α 1-3Gal β 1-(3)4GlcNAc-R (Gal- α), welches durch das

Glykosylierungsenzym Alpha1,3galactosyltransferase (alpha1,3GT) an Glykoproteinen und -lipiden synthetisiert wird [135, 136]. 2002 gelangen Lai et al. die Elimination von alpha1,3GT in Schweinen, wodurch das Gal-alpha-Epitop nicht mehr gebildet wurde [137]. Neue Generationen von Gal-alpha-negativen Schweinen lassen die Umsetzung von Xenotransplantationen ins Greifbare rücken [138]. Im Januar 2022 wurde erstmals einem Menschen erfolgreich ein gal-alpha-negatives Schweineherz transplantiert [107]. Zusätzlich besteht bei xenogenem Transplantationsmaterial das Risiko einer Übertragung unbekannter pathogener Mikroorganismen [139, 140]. Durch die in dieser Arbeit vorgestellte Dezellularisierung der porcinen Kornea sowie des Limbus kann das Infektionsrisiko durch das Gewebe minimiert werden. Das immunogene Potential wird ebenfalls durch die Dezellularisierung auf ein Minimum reduziert [141]. Da das Schwein bereits als Nutztier und Nahrungsmittel gezüchtet wird, wäre eine Akzeptanz von porcinem Transplantationsmaterial durch den Patienten wahrscheinlich. Eine Umfrage ergab, dass 74% der befragten Menschen ein xenogenes Transplantat bei Bedarf akzeptieren würden [142]. Allerdings gibt es ethische Bedenken, Schweine als reine Organspender zu züchten. Ebenfalls sind Ablehnungen aus religiösen Gründen denkbar, beispielsweise bei muslimischen Patienten. Dennoch rückt es durch Gentechnik in den Bereich des Möglichen, histokompatible Organe zu konstruieren und virusfreie Schweinerassen zu züchten, um die Übertragung von endogenen Retroviren zu verhindern [134, 137, 143]. Richtlinien in Bezug auf ethische, rechtliche, moralische und religiöse Fragen wurden bereits erstellt [134, 144]. Deshalb ist die erfolgreiche Expansion von LESC auf einem dezellularisierten porcinen Limbus und damit die potentielle Nutzung als Trägermatrix für die Transplantation in Patienten ein wichtiger Schritt zu einem möglichen neuen Therapieansatz bei einer LSCD.

Zhang et al. zeigten bereits, dass dezellularisiertes humanes Hornhautstroma als Untergrund für eine Expansion von kornealen und limbalen Stammzellen dienen kann [128]. Auch Poliseti et al. untersuchten die dezellularisierte humane Kornea und re-besiedelten sie mit LESC, Stromazellen und Melanozyten *in vitro* und führten eine Lamellentransplantation *in vivo* durch. Sie zeigten, dass die dezellularisierte Kornea den Stammzellen eine Mikroumgebung bietet, in der sie in einem wenig differenzierten Stadium verweilen [74]. Notara et al. wiesen den porcinen Limbus und die Kornea als geeignetes Modell für die Untersuchung von LESC-Kolonien und deren Schicksal nach Transplantationen aus, da dieser eine vergleichbare Anatomie mit dem humanen Limbus aufweist, besonders in Bezug auf die Verteilung von Krypten und die Ausprägung der Vogt-Palisaden [31]. Weiterführend zu diesen Studien wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich speziell der humane und porcine Limbus als Wachstumsuntergrund für eine Expansion von LESC

eignen und wie sich der Erhalt der Stammzellnische und ihrer Umgebung auf die Entwicklung des Phänotyps der LESC auswirkt. Es konnte gezeigt werden, dass eine *ex-vivo* Expansion von LESC auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus möglich ist. Hierbei stellte sich der humane Limbus mit einer Erfolgsrate der Re-Epithelialisierungen von 85% in Hinblick auf die Expansion von humanen LESC als besserer Untergrund als der porcine Limbus heraus mit einer Erfolgsrate von 56%.

Eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen Erfolg liegt in der Anatomie der porcinen Kornea. Diese ist physiologisch etwas dicker und stärker gebogen als die humane Kornea [105]. Obwohl die Korneae am Ende des Dezellularisierungsvorgangs mit Hilfe von Glycerol entquollen wurden, hatten die porcinen Korneae eine stärkere Tendenz aufgequollener zu bleiben. Dies begünstigt das Abrutschen der Zellen von der Kornea nach der Aussaat, wodurch die Anzahl der anhaftenden und schließlich anwachsenden Zellen sinkt. Dennoch waren die Re-Epithelialisierungen des porcinen Limbus bei deutlich mehr als der Hälfte der Proben erfolgreich. Eine weitere Erklärung ist, dass die humane EZM besser als Wachstumssubstrat für die humanen LESC geeignet ist als die porcine EZM. Auch O'Neill et al. konnten in ihrer Studie über die Dezellularisierung der humanen und porcinen Lunge nachweisen, dass beide Gewebe die Kultivierung von Lungenzellen in ähnlicher Weise unterstützen, die humane EZM jedoch zu einer höheren metabolischen Aktivität der Zellen führte als die porcine EZM [145]. Dies stellte das humane Gewebe in diesem Punkt ebenfalls als besseren Wachstumsuntergrund heraus.

Bei beiden Materialien wäre eine *in vivo* Erprobung klinisch umsetzbar. Die Transplantation von humanem Spendermaterial ist etabliert und ein fester Bestandteil der Medizin. Auch porcines Gewebe wird bereits klinisch genutzt. Durch die in dieser Arbeit angewandte Dezellularisierung des Limbus wäre die Anwendung sowohl des humanen als auch des porcinen Wachstumssubstrats *in vivo* möglich.

4.2 Re-Besiedlungsmethoden

In dieser Studie wurde für die Re-Epithelialisierungen die Suspensionskulturtechnik verwendet. Die zuvor gewonnenen primären, humanen LESC wurden in einer definierten Dichte auf das dezellularisierte Gewebe aufgebracht. Diese Methode findet sich in einer Vielzahl anderen Studien wieder [128, 146, 147]. Eine ebenfalls häufig angewandte Methode ist die Explantatkulturtechnik, bei der ein komplettes Gewebestück durch eine Biopsie gewonnen und auf den Wachstumsuntergrund gepflanzt wird. Es konnte bereits gezeigt werden, dass LESC aus einer kleinen Limbus-Biopsie unter Erhalt des Phänotyps

und der proliferativen Eigenschaften auswachsen [148, 149]. Zhang et al. zeigten hingegen, dass die Zellsuspensionskulturtechnik im Stammzellerhalt der Explantatkulturtechnik überlegen ist, da die Zellen direkt in das Kultursystem eintreten können [150]. Dies relativierend stellten sowohl Kim et al. als auch Polisetti et al. keinen Unterschied zwischen beiden Methoden in Bezug auf Phänotyp- und Stammzellerhalt fest [151]. Bei beiden Re-Besiedelungen behielten die LESC ihren ursprünglichen Phänotypen [74]. Um sicher zu gehen, dass LESC nach Aussaat sowohl den Limbus als auch die zentrale Kornea re-besiedeln, wurde in diesem Projekt die Suspensionskulturmethode gewählt.

4.3 Der dezellularisierte humane und porcine Limbus erhalten die Stammzelleigenschaften von LESC nach Re-Epithelialisierung

Nach Aufzeigen der erfolgreichen Expansion von LESC auf dezellularisiertem Limbus, wurde in dieser Arbeit darauffolgend der Stammzellerhalt der LESC untersucht. Dafür wurden basierend auf dem gegenwärtigen Forschungsstand Marker für die Analyse der Stammzeleigenschaften nach Aussaat auf dezellularisiertem Limbus ausgewählt [28].

Der Progenitorzellmarker p63 wird seit 2001 [29], beziehungsweise seine spezifischere Isoform $\Delta Np63\alpha$ seit 2005 [30] als Marker für LESC genutzt. Zhang et al. wiesen die Expression von p63 in LESC bis zwei Wochen nach Aussaat auf einem dezellularisierten humanen Hornhautstroma *in vitro* nach [128]. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Expression von p63 α sogar bis drei Wochen nach Aussaat auf einem dezellularisierten humanen oder porcinen Limbus nachgewiesen werden. Dabei war die Expressionsstärke an Tag 21 nicht geringer als an Tag 3. An Tag 21 exprimierten durchschnittlich 10% der LESC aus den humanen Proben und 29% der LESC aus den porcinen Proben p63 α . Eine immunhistochemische Färbung nach 24 h hätte durch die Kenntnis der Anzahl der positiven Zellen direkt nach der Kultivierung einen besseren zeitlichen Verlauf ermöglicht.

In weiteren Studien wurden die Progenitormarker ABCG2 und CK 15 als Marker für LESC vorgestellt [34, 55, 152]. Eine Expression von ABCG2 in Epithelzellen, ausgesät auf eine dezellularisierte humane Kornea, konnten Shafiq et al. nach zwei Wochen detektieren [153]. Analog zu dieser Studie konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die LESC sogar bis drei Wochen nach Aussaat auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus ABCG2 sowie CK 15 exprimierten. Die Expressionsstärke war an Tag 21 gleichbleibend zu Tag 3. Dabei betrug die Anzahl der positiven Zellen nach drei Wochen für ABCG2 71% in den humanen und 81% in den porcinen Proben sowie für CK 15 49,5% in den humanen und 28,5% in den porcinen Proben. In Zusammenschau ergeben die unveränderte

Detektion der drei Marker sowie die durchschnittlich hohe Anzahl an positiven Zellen nach drei Wochen, dass sich die Anzahl der LESC nach drei Wochen Wachstum in einem dezellularisierten humanen und porcinen Limbus nicht reduziert hat. Der dezellularisierte Limbus scheint demnach dafür geeignet, die Stammzeleigenschaften der Zellen langfristig zu erhalten.

Entscheidend für einen idealen Wachstumsuntergrund ist der Erhalt der Stammzeleigenschaften und damit einhergehend die gleichzeitige Verhinderung der vollständigen Ausdifferenzierung zu Epithelzellen. Um zu überprüfen, ob der dezellularisierte Limbus eine vorzeitige Ausdifferenzierung unterbindet, wurden die Epithelzellmarker CK 3 und 12 untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass es zu keinem Anstieg der Expression dieser Marker innerhalb von drei Wochen nach Re-Besiedelung kam. Dem dezellularisierten Limbus ist es demnach möglich, eine Ausdifferenzierung der Stammzellen durch ihren Eigenschaftserhalt zu verhindern. Die von Spaniol et al. aufgestellte Vermutung, dass der dezellularisierte Limbus das Überleben von allogenen LESC ohne Verwendung eines *Feederlayers* unterstützt, wurde in dieser Studie bestätigt [77]. *Feederlayer*-Zellen sind proliferations-gehemmte, aber vitale Zellen, die durch Ausschüttung verschiedener wachstumsfördernder Proteine das Wachstum von primären Zellen wie LESC *in vitro* unterstützen und im Falle der LESC ein frühes Ausdifferenzieren verhindern. Voraussetzung für ein Wachstum ohne *Feederlayer* sind extrazelluläre Matrixkomponenten wie Laminin, Kollagen oder Fibronectin, welche die Zellen stattdessen umgeben [154]. Kommt eine klinische Anwendung in Betracht, sollten die Sicherheitsrisiken durch den meist murinen *Feederlayer* berücksichtigt werden. Kreuzübertragungen von Tierpathogenen auf die Zellkultur sind möglich, welche zusätzlich zu den fremden Antigenen eine Immunantwort im Zielwirt auslösen können [155]. Wird eine Nutzung der Zellen im Patienten angestrebt, sollte deshalb eine Expansion der LESC ohne *Feederlayer* genutzt werden.

Im direkten Vergleich zwischen Limbus und zentraler Kornea konnten in Bezug auf den Stammzellerhalt und die Ausdifferenzierung der Zellen nach 3 Wochen Kultivierung keine Unterschiede detektiert werden. Dies stellt die Kornea an sich als förderlich für das Wachstum der Stammzellen heraus, aber nicht den Limbus im Speziellen. Nun sollte der Forschungsschwerpunkt darauf ausgerichtet werden, ob die dezellularisierte Stammzellnische eine positive Auswirkung bei einem dauerhaften Wachstum der LESC in ihr gegenüber der Kornea hat. Sprich eine Ausweitung des Zeitraumes sollte einer der nächsten Schritte in diesem Projekt sein. Vorstellbar wäre daher, dass die Zellen auf der zentralen Kornea nach langfristiger Kultivierung eher zu einem Ausdifferenzieren neigen als LESC, welche im Limbus kultiviert wurden.

Der Einfluss des untersuchten dezellularisierten Gewebes auf die Stammzeleigenschaften der LESC fand im Vergleich mit dem Einfluss einer herkömmlichen 2D-Zellkulturschale statt. Herkömmliche Zellkulturschalen sowie Multi-Well-Platten sind auf eine ideale Adhäsion von Zellen ausgelegt. Sie bestehen aus Polystyrol, welches für eine besser Anhaftung der Zellen unter anderem mit Plasma behandelt wird. Es entsteht eine zellfreundliche Beschichtung [156, 157], wodurch sie gute Wachstumsbedingungen für Zellen aufweisen. Um zu untersuchen, ob dezellularisiertes korneales Gewebe ebenfalls diese fördernden Bedingungen für Zellen bietet, wurden die Stammzeleigenschaften von LESC gewachsen auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus (Proben) mit den auf Kunststoff gewachsen Kontrollen verglichen. Tendenziell konnte eine gesteigerte Expression der Stammzellgene in den Proben verglichen zu der Kontrolle beobachtet werden, wenn auch statistisch nicht signifikant. Es konnte sowohl mittels Fluoreszenzfärbung ein Erhalt der Stammzeleigenschaften über 21 Tage dokumentiert als auch mittels qrt-PCR ein klarer Trend aufgezeigt werden, dass die Stammzellen ihren ursprünglichen Phänotypen besser auf dezellularisiertem kornealen Gewebe erhalten können als auf Kunststoff. Auch hier wäre ein längerer Beobachtungszeitraum wünschenswert, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erzielen. Weiterhin war aufgrund der langen Wachstumszeiten und der Nutzung von primären, humanen LESC die Anzahl der Proben insgesamt eingeschränkt. Eine Steigerung der Probenzahl würde vermutlich hier zu final signifikanten Ergebnissen führen.

In der Untersuchung der Stammzeleigenschaften mittels qrt-PCR konnten ABCG2, p63 α und CK 15 auf RNA-Ebene bis Tag 21 ebenfalls nachgewiesen werden. In diesem Experiment wurde jedoch die Kultivierungsdauer als signifikanter Einflussfaktor auf die Expression der Gene detektiert; je länger die Korneae kultiviert wurden, desto geringer war die nachgewiesene Expression der Stammzellgene. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen der Fluoreszenzfärbungen, die im Limbus keinen Rückgang der Progenitormarker beziehungsweise keinen Anstieg der Epithelzellmarker an Tag 21 im Vergleich zu Tag 3 gezeigt haben. Nun stellt sich die Frage nach der Ursache dieser Diskrepanz. Bei den Färbungen wurde nicht die gesamte Kornea beziehungsweise der gesamte Limbus untersucht, sondern lediglich 3 Schnitte pro Präparat. Im Gegensatz dazu, wurden bei der qrt-PCR alle Zellen auf der Kornea abgelöst und untersucht. So kann es sein, dass die immunhistochemischen Färbungen nicht repräsentativ für die gesamte Kornea oder den Limbus sind. Die qrt-PCR hingegen hat auch die Bereiche der Kornea dargestellt, die von den Färbungen nicht erfasst wurden und eventuell weniger LESC beinhalteten. Zusätzlich kann es sein, dass die für die Färbungen verwendeten Antikörper nicht ideal

waren, wodurch sensible Unterschiede in den Progenitoreigenschaften nicht erfasst werden konnten. Dennoch wurden aus diesem Experiment wichtige Erkenntnisse gewonnen. So zeigte sich, dass der humane und porcine Limbus die Stammzeleigenschaften gleichermaßen beeinflussten und sich die Zellen auf beiden Untergründen vergleichbar verhielten. Ebenfalls konnte mittels Immunhistochemie und qrt-PCR aufgezeigt werden, dass es zu keinem Anstieg der pro-apoptotischen Marker Bax und Caspase 3 über 21 Tage kam. Dies bedeutet, dass die LESC nicht vermehrt in den Zelltod nach Aussaat auf dezellularisiertem Gewebe gingen. Dies stimmt mit der Aussage von Spaniol et al. überein, dass von dem Dezellularisierungsprozess zur Herstellung des zellfreien Limbus keine Zellzytotoxizität ausgeht [77]. Wird dies in Bezug gesetzt mit dem Ergebnis der Schichtanzahl-Messung, dass die Kultivierungsdauer einen signifikant positiven Einfluss auf die Schichtdicke ausübt, so findet sich hier eine weitere Bestätigung für ein vitales Epithel auf dem dezellularisierten Gewebe. Der Nachweis der konstanten Expression des Proliferationsmarkers Ki67 in der humanen Probe unterstützt diese Aussage erneut. Gleichzeitig sank in der porcinen Probe die Expression von Ki67 um circa 89% von Tag 3 bis Tag 21. Dies zeigt eine Veränderung des Proliferationsverhaltens der LESC auf dem porcinen Limbus nach drei Wochen, wodurch der humane Limbus als wachstumsfördernder herausgestellt wird.

Zusammenfassend wurde nachgewiesen, dass der dezellularisierte Limbus die Stammzellen über einen längeren Zeitraum hinweg in ihrem ursprünglichen Phänotyp erhalten kann und nach drei Wochen die Stammzellen noch nachweisbar sind. Dies stützt die Erkenntnis von Spaniol et al., dass der Limbus durch die Dezellularisierung sein 3D-Gerüst nicht verändert und weiterhin seine für die Stammzellnische spezifischen Eigenschaften aufweist [77]. Der Erhalt der regenerativen Funktion der Stammzellen ist der entscheidende Faktor bei der Transplantation von *ex-vivo* kultivierten LESC aufgetragen auf eine Trägermatrix. Dies bestimmt den langfristigen Therapieerfolg und ist damit ein wichtiges Ziel bei der Etablierung einer neuen Trägermatrix für die Therapie einer bilateralen LSCD. In dieser Arbeit konnte erstmalig aufgezeigt werden, dass der dezellularisierte Limbus diesen entscheidenden Faktor erfüllt. Das Ausbleiben eines Expressionsanstiegs der pro-apoptotischen Marker Caspase 3 und Bax sowie das Nicht-Absinken des Proliferationsmarkers Ki67 in den humanen Proben zeigt deutlich, dass die Stammzellen vital auf dem dezellularisierten Gewebe sind und dort ihre Funktion ausüben können. Durch die Abnahme der Expressionsstärke von Ki67 in den porcinen Proben kann angenommen werden, dass das humane im Vergleich zum porcinen dezellularisierten Gewebe einen stärkeren proliferationsfördernden Einfluss auf die LESC ausübt. In Bezug auf den Stammzellerhalt, gemessen mit qrt-PCR und Immunhistochemie, konnte kein Unterschied zwischen

beiden Untergründen detektiert werden. Insgesamt zeigen sich in dieser Arbeit sowohl der dezellularisierte humane als auch der porcine Limbus als mögliche Trägermatrix für die *ex-vivo* Expansion von LESC.

4.4 Die Kultivierungsart hat keinen Einfluss auf eine Epithel-Stratifizierung und den Erhalt der Stammzeleigenschaften

Der Vergleich zwischen einer sogenannten air-liquid-Interface (ALI) Kultivierung und einer konventionellen Kultivierung der re-epithelialisierten Korneae diente der Frage, ob ein ALI dabei hilft, den physiologischen Zustand eines fünf- bis siebenschichtigen Epithels *ex-vivo* herbeizuführen. Durch eine intermittierende Benetzung der Zellen mit Medium, wird das natürliche Aufreißen des Tränenfilms zwischen zwei Lidschlägen imitiert. Eine terminale Differenzierung soll dadurch angeregt und das Epithel bei einer Stratifizierung unterstützt werden. In der vergleichenden Literatur zeigt ein ALI genau diesen Effekt [128, 158-160]. So fanden Wang et al. heraus, dass die Kultivierung einer Kaninchenhornhaut in einem ALI zu einer Stratifizierung des Epithels und zu einer stärkeren Bindung zwischen den Zellen geführt hat [161].

Die zweite These dieser Arbeit, welche besagte, dass ein ALI förderlicher für das mehrschichtige Wachstum der Zellen ist als eine submerse Kultivierung, konnte nicht bestätigt werden. Es konnte zwar übereinstimmend mit der aktuellen Studienlage nachgewiesen werden, dass es unter ALI-Bedingungen zu einer Mehrschichtigkeit kommt, allerdings war diese nicht stärker ausgeprägt als bei der verglichenen Kultivierungsart. Somit stellte sich die submerse Kultivierung auf dezellularisiertem Limbus in dieser Studie als genauso effektiv dar wie das ALI. Auch hier kann die Dauer der Kultivierung von nur 3 Wochen eine Rolle spielen und sollte in nachfolgenden Studien entsprechend verlängert werden.

Als signifikanten Einflussfaktor konnte stattdessen die Kultivierungsdauer ausgemacht werden. Je länger die re-besiedelten Korneae kultiviert wurden, desto mehr Schichten bildete das Epithel. Diese Erkenntnis ist wichtig, da eine proportional zur Kultivierungsdauer steigende Schichtanzahl den Erhalt der Zellteilungseigenschaften und die Vitalität der Zellen, ausgesät auf dezellularisiertem Limbus, über drei Wochen *ex-vivo* bedeutet.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass der humane Limbus in der ersten Woche nach Re-Epithelialisierung förderlich bei der Ausbildung einer Mehrschichtigkeit war. Dadurch, dass der dezellularisierte Limbus seine ursprüngliche Anatomie aufweist und damit die Eigenschaften der Stammzellnische innehat, kann er den Stammzellen als optimaler Untergrund dienen und diese beim Wachstum unterstützen [77]. Allerdings bestand

dieser positive Effekt nach sieben Tage nicht mehr und Limbus und zentrale Kornea wiesen eine vergleichbare Zellschichtung auf.

Zudem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die LESC auch unter ALI-Bedingungen wachsen und reguliert werden können. Die Untersuchung der Progenitormarker zeigte, dass LESC in ALI ihre Progenitoreigenschaften vergleichbar gut erhalten können wie LESC aus einer konventionellen Kultivierung. Bei der Betrachtung der Epithelzellschichten im Limbus aus einem ALI, wird eine tendenzielle Steigerung der Schichten zwischen Tag 7 und Tag 21 sichtbar. Vergleichend dazu sank die Zahl der Schichten auf der zentralen Kornea. Auch in einer konventionellen Kultivierung wurden im Limbus und auf der zentralen Kornea ein Abfall der Schichtanzahl zwischen Tag 7 und Tag 21 beobachtet. Somit scheint ein ALI einen positiven Effekt auf die Ausbildung von Mehrschichtigkeit im Limbus zu haben.

Studien haben gezeigt, dass CK 3 von LESC nicht exprimiert wird. Nach einer Differenzierung zu *Transient Amplifying Cells* und schließlich zu terminalen Epithelzellen ist dies jedoch ein verlässlicher Marker zur Detektion der ausdifferenzierten Zellen [5, 162]. In der Analyse der Stammzeleigenschaften wurde festgestellt, dass diejenigen Zellen, die sich in einem ALI auf einer humanen Kornea befanden, mehr CK 3 exprimierten als diejenigen, die aus einer konventionellen Kultivierung stammten. Die Kultivierung unter ALI führt also zu einer vermehrten Ausdifferenzierung der LESC in unseren Versuchen. Dies wird durch Ergebnisse aus anderen Studien gestützt, welche bereits zeigten, dass ein ALI die Differenzierung der Stammzellen zu Epithelzellen anregt [6, 163]. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Teilungsrate der LESC in den humanen Proben unter ALI-Bedingungen nachgewiesen. Dies zeigt sich durch die steigende Anzahl differenzierter Zellen bei gleichzeitigem Erhalt der Progenitoreigenschaften sowie durch die vermehrte Expression von Ki67 an Tag 21 in ALI im Vergleich mit einer konventionellen Kultivierung. Vermehrt migrieren Zellen unter Differenzierung auf die zentrale Kornea und werden zu Epithelzellen, während gleichzeitig im Limbus die Tochterzellen als Progenitorzellen verbleiben. Diese erhöhte Teilungsrate findet sich nicht in den porcinen Proben unter ALI, was erneut aufzeigt, dass der humane dezellularisierte Limbus bessere Eigenschaften als der porcine dezellularisierte Limbus für die humanen LESC aufweist.

In der Gesamtschau der Ergebnisse konnte ein positiver Effekt des ALI bei der Ausbildung von Mehrschichtigkeit im Limbus gezeigt werden. Während der Erhalt der Progenitoreigenschaften der LESC unter ALI und konventioneller Kultivierung sowohl auf dem humanen als auch auf dem porcinen Gewebe vergleichbar gut war, zeigte sich an Tag 21 in den

humanen Proben eine verstärkte Expression von Ki67 und CK 3 bei Kultivierung in ALI. Dadurch unterstützen die Daten dieser Arbeit weitere Studien, die ebenfalls eine erhöhte Differenzierung der Zellen in ALI beschrieben. Weiterführend konnte nachgewiesen werden, dass ein ALI das proliferative Wachstum der LESC auf dem humanen Limbus fördert. Daher lässt sich schlussfolgern, dass final eine Kultivierung unter ALI-Bedingungen je nach weiterer geplanter Anwendung für das Gewebe von Vor- oder Nachteil sein kann. Sollen die Zellen in Patienten transplantiert werden, wäre es eher von Nachteil schon zu viele ausdifferenzierte Zellen zu haben; soll das Gewebe beispielsweise als Labormodell genutzt werden, wäre diese Ausdifferenzierung von Vorteil, da es die native Gegebenheit besser darstellt.

4.5 Die dezellularisierte Kornea erhält das Proliferationsverhalten von LESC

Eine Trägermatrix, auf der LESC zwar anwachsen, sich aber nicht vermehren können, ist nicht geeignet, eine Krankheit zu therapieren, bei der der Erhalt der Teilungsfähigkeit der transplantierten LESC essentiell ist. Deshalb spielt die Untersuchung der Proliferation eine zentrale Rolle in dieser Arbeit. Die Entscheidung, die Proliferation der Zellen mittels WST-1-Assay nur aus einer konventionellen Kultivierung zu untersuchen, beruht auf der allgemeinen Forschungsmeinung, dass ein ALI Einfluss auf die Differenzierung von Zellen hat, aber nicht auf deren Proliferationsverhalten. Um dennoch die Teilungsfähigkeit von LESC aus beiden Kultivierungen vergleichen zu können, wurde zusätzlich die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 mittels Immunhistochemie untersucht. Gleichzeitig fand ein Vergleich des Einflusses des dezellularisierten Gewebes auf die Proliferations-eigenschaften der LESC mit der Kultivierung in einer herkömmlichen 2D-Zellkulturschale statt. So konnte untersucht werden, ob das dezellularisierte Gewebe eine gute Wachstumsunterlage für LESC bietet.

Durch den Proliferationsassay konnte gezeigt werden, dass LESC auf dezellularisiertem kornealen Gewebe mindestens drei Wochen proliferieren. Außerdem bestätigen und führen diese Resultate die Erkenntnis der Studie von Huang et al. fort. Dort wurde ebenfalls eine Bewahrung der Proliferationsfähigkeit von LESC beobachtet, nachdem sie auf ein azelluläres porcines Hornhautstroma gesät und in ein Kaninchen transplantiert wurden [164]. Dabei wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass das Proliferationsverhalten der LESC nach Re-Epithelialisierung auf dezellularisiertem kornealen Gewebe gleichermaßen ausgeprägt waren wie bei einem Wachstum der Zellen in Zellkulturschalen. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die für die Dezellularisierung verwendeten Substanzen

nicht toxisch sind und damit keinen negativen Einfluss auf das Zellwachstum auszuüben scheinen. Allerdings konnte auch kein positiver Effekt nachgewiesen werden, was das dezellularisierte Gewebe als gleichwertig mit einer Zellkulturschale darstellt. Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass sich das porcine dezellularisierte Gewebe förderlicher auf die Proliferationseigenschaften der Stammzellen auswirkt als die Kontrolle. Zu sehen an einer tendenziell relativ gesteigerten Proliferation an Tag 21 der porcinen Probe im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz dazu scheint es in der humanen Probe eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Proliferation zu geben. Das ist auch stimmig mit der Untersuchung des Apoptosegens Bax aus der qrt-PCR, welches in der humanen Probe an Tag 7 scheinbar mehr exprimiert wird als von der Kontrolle. Dadurch steigt die Zahl apoptotischer Zellen und die Zahl der proliferierenden Zellen geht zurück. Dieser Trend wurde statistisch nicht nachgewiesen. Durch eine Erhöhung der Probenanzahl kann dieser Trend eventuell statistisch signifikant nachgewiesen werden.

Die Expression von Ki67 sank immunhistochemisch über 21 Tage in den porcinen Proben, wobei gegensätzlich im Proliferationsassay eine steile Wachstumskurve nachgewiesen werden konnte, die an Tag 21 scheinbar über der Proliferation der Kontrolle lag. Diese gegensätzlichen Ergebnisse der beiden Experimente könnten auf die unterschiedliche Auswertmethodik zurückzuführen sein. Das immunhistochemisch nachgewiesene Protein Ki67 lagert sich während der Mitose an die Chromosomen und wird vom verwendeten Antikörper detektiert [165]. Die Detektion von Ki67 ist demnach proportional zur Menge der sich teilenden Zellen. Der Proliferationsassay hingegen basiert auf der Verstoffwechslung einer Substanz. Je mehr vitale Zellen in der Probe sind, desto mehr wird von der Substanz verstoffwechselt. Eine Differenz zwischen zwei Assays einer Probe an zwei verschiedenen Zeitpunkten, entsteht durch eine unterschiedlich starke Verstoffwechslung. Wenn an Zeitpunkt 2 mehr Substanz verstoffwechselt wird als an Zeitpunkt 1, ist dies durch eine Zunahme der vitalen Zellen möglich und damit als relative Zunahme der Proliferation in diesem Zeitraum zu verstehen. Die steigende relative Wachstumskurve an Tag 21 zeigt demnach, dass die Zellen auf der porcinen Probe zwischen Tag 7 und Tag 21 weiterhin proliferierten und an Tag 21 mehr vitale Zellen vorhanden sind. Ob sich diese vitalen Zellen genau an Tag 21 in Mitose befinden, wird nicht angezeigt, weswegen die fallende Detektion von Ki67 an Tag 21 diesem Ergebnis nicht widerspricht. Die statistische Auswertung zeigte jedoch, dass die Expression von Ki67 abhängig von der Kultivierungsdauer ist. Je länger die Zellen auf der Kornea kultiviert wurden, desto geringer war die Expression von Ki67. Dies lässt schlussfolgern, dass sich das Proliferationsverhalten der LESC nach drei Wochen Kultivierung auf einer dezellularisierten Kornea verändert und

abnimmt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wäre ein längerer Beobachtungszeitraum notwendig.

Als Fazit ist festzuhalten, dass sowohl die dezellularisierte humane als auch porcine Kornea die Proliferation von LESC nach Re-Epithelialisierung erhält. Dabei können die untersuchten Wachstumsuntergründe für die LESC ebenso gute Wachstumsbedingungen bieten wie der beschichtete Kunststoff einer Multi-Well-Platte. Zusätzlich bietet das dezellularisierte Gewebe die Möglichkeit, direkt mit den darauf wachsenden Zellen in den Patienten transplantiert zu werden. Die Notwendigkeit eines Zelltransfers auf eine Transplantationsmatrix entfällt, wie es bei einer *ex-vivo* Kultivierung in einer Zellkulturflasche der Fall wäre. Dies zeigt in Zusammenschau mit den positiven Ergebnissen aus der Untersuchung des Stammzellerhalts, dass das dezellularisierte korneale Gewebe einen geeigneten Untergrund für LESC darstellt. Bei der Verwendung des dezellularisierten Limbus als Trägermatrix für LESC mit anschließender Transplantation wäre ein Erhalt der regenerativen Fähigkeiten der Stammzellen wahrscheinlich, wodurch der Erfolg der Therapie entschieden gesteigert wäre. Langzeituntersuchungen würden Gewissheit über das Proliferationsverhalten der LESC über den hier untersuchten Zeitraum hinaus geben.

4.6 Der dezellularisierte humane und porcine Limbus unterscheiden sich nicht in Bezug auf Expansion und Kultivierung von LESC

Seit 2011 nimmt die Zahl der Organspender ab, die reine Gewebespende ist von diesem Verlauf jedoch nicht betroffen [166]. Stattdessen kann sogar eine steigende Spenderbereitschaft für Hornhäute verzeichnet werden [167]. Dennoch findet sich eine erhebliche Diskrepanz zwischen Gewebebedarf und Gewebespende [168]; die durchschnittliche Wartezeit auf eine Spenderhornhaut beträgt aktuell drei bis 24 Monate [169]. Deshalb ist es von großer Wichtigkeit, alternative Materialien zu erforschen, um den Mangel an vorhandenem Gewebe auffangen zu können. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen der dezellularisierte humane Limbus, aber auch der dezellularisierte porcine Limbus als Trägermatrix für LESC als Therapieoption bei bilateraler LSCD untersucht. Der bei einer Keratoplastik nicht verwendete korneosklerale Ring kann für eine Transplantation bei einer LSCD genutzt werden [77]. Durch die Dezellularisierung des Gewebes können oft ehemals verworfene Korneae verwendet werden, da Pathogene und Immungene entfernt werden [130, 141]. Die Nutzung porciner Korneae im Menschen würde die Diskrepanz zwischen Bedarf und Mangel weiter verringern.

Es wurde nachgewiesen, dass die Expansion von *ex-vivo* kultivierten LESC auf einem humanen dezellularisierten Limbus zwar durch eine höhere Erfolgsquote aussichtsreicher als auf einem dezellularisierten porcinen Limbus ist, aber dass dennoch auf beiden die Stammzellen mehrheitlich erfolgreich kultiviert werden konnten. Die Spezies des Limbus übte keinen Einfluss auf die Schichtanzahl aus und die Expressionen des Proliferations- und pro-apoptotischen Markers waren zwischen beiden Spezies nach drei Wochen gleich stark. Sowohl die Teilungsfähigkeit der LESC als auch die Vitalität der Zellen scheint demnach auf beiden Korneae ähnlich zu sein. Allerdings lässt die sinkende Detektion von Ki67 in der porcinen Probe an Tag 21 vermuten, dass die proliferativen Fähigkeiten der Zellen auf diesem Wachstumsuntergrund nachlassen. Dies stellt den humanen Limbus als wachstumsfördernder heraus als den porcinen Limbus. Im Zusammenschluss der Experimente konnten keine Unterschiede in der Progenitorzellmarker-Expression gefunden werden, weswegen von einer Vergleichbarkeit des humanen und porcinen Limbus in Bezug auf den Erhalt der Stammzeleigenschaften ausgegangen werden kann. Es fand sich eine signifikante gesteigerte Expression von CK 3 in den humanen Proben im Vergleich zu den porcinen Proben. Diese stärkere Expression deutet auf eine höhere Differenzierungsneigung der Stammzellen auf dem humanen Limbus hin. Da die Progenitorzellmarker jedoch zwischen Tag 3 und Tag 21 gleichbleibend stark in dem humanen Limbus detektiert wurden, wurden die Stammzeleigenschaften dennoch ausreichend bewahrt.

Im Vergleich des Limbus mit der zentralen Kornea zeigten sich keine Unterschiede im Erhalt der Stammzeleigenschaften oder in Bezug auf das Proliferationsverhalten der LESC. Da die Zellen außerhalb der Nische gleichwertig wachsen konnten, stellt dieses Ergebnis die physiologische Regulation der Stammzellen durch die ursprüngliche Nischenumgebung als Alleinstellungsmerkmal des Limbus in Frage. Wichtig sind nun Langzeitverlaufs-Untersuchungen des dezellularisierten Gewebes. Die Daten dieser Arbeit bilden die ersten drei Wochen nach Aussaat von LESC ab, in denen sich keine Unterschiede zwischen Limbus und zentraler Kornea zeigten. Es ist jedoch zu vermuten, dass langfristig die Zellen auf der zentralen Kornea ausdifferenzieren, da den LESC ihre physiologische Stammzellnische verwehrt bleibt. Dennoch konnten in dieser Arbeit viele Erkenntnisse über den Limbus als Wachstumsuntergrund erworben werden. Die Dezellularisierung bewahrt die Funktion des Limbus unter gleichzeitiger Verringerung des immunologischen Potentials. Er ist in der Lage, über einen Zeitraum von drei Wochen die Stammzellen zu erhalten und ihre regenerative Fähigkeit zu fördern.

4.7 Wissenschaftliche Implikationen

Aus dieser Arbeit ergeben sich drei wesentliche Erkenntnisse für die Forschung:

1. Eine Expansion von *ex-vivo* kultivierten LESC auf dezellularisiertem humanen und porcinen Limbus ist möglich.
2. Der dezellularisierte humane und porcine Limbus erhalten die proliferativen Fähigkeiten der Stammzellen.
3. Der dezellularisierte humane und porcine Limbus erhalten die Stammzeleigenschaften der LESC nach Re-Epithelialisierung über 21 Tage.

Die hier aufgeführten Gesichtspunkte ermöglichen es erstmals, den dezellularisierten porcinen Limbus als Wachstumsuntergrund in Betracht zu ziehen. Es wurde eine Trägermatrix aufgezeigt, die kostengünstig gewonnen werden kann und in einer hohen Anzahl vorhanden ist. Dies ist besonders in der heutigen Zeit essentiell, in der ungefähr 10 mal mehr Organe benötigt als gespendet werden (Stand 2020 [170]). Auch der Nachweis der erfolgreichen Re-Besiedelung des dezellularisierten humanen Limbus ist wichtig. Durch eine Dezellularisierung des Gewebes und eine Entfernung der Zellen kann eine größere Zahl von Spenderkorneae eingeschlossen und verwendet werden. Fortführend bedeutet dies zum einen, dass sowohl der humane als auch der porcine dezellularisierte Limbus als mögliche Trägermatrices für LESC vorgestellt wurden. Beide können in der Therapie einer bilateralen LSCD eingesetzt werden und unterscheiden sich nicht in ihrer positiven Auswirkung auf die Stammzellen. Durch den Erhalt der Stammzellnische wird eine natürliche Regulation und somit der Langzeiterhalt der Stammzeleigenschaften sowie des Proliferationsverhaltens ermöglicht. Bei beiden Matrices werden die physiologischen Gegebenheiten der Stammzellnische mit dem Vorteil der Immunogenfreiheit verbunden. Zum anderen können LESC ohne die Verwendung eines *Feederlayers* auf diesen Matrices kultiviert werden. Die natürliche Nischenumgebung sorgt für einen Stammzellerhalt, wodurch das immunologische Potential zusätzlich zur Dezellularisierung verringert werden kann.

4.8 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit ebnen den Weg für weitere Forschungen am dezellularisierten Limbus beider Spezies als Wachstumsuntergrund für LESC. Um das volle Potential des dezellularisierten Limbus erforschen zu können, sollte dieser in größer angelegten Studien untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der humane als auch der porcine dezellularisierte Limbus in der Lage sind, eine Expansion von LESC auf ihm zu ermöglichen und in einem Zeitraum von drei Wochen ihre Zellteilungsfähigkeit und die

Stammzeleigenschaften zu erhalten. In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, inwiefern sich diese Eigenschaften in einem längeren Zeitraum verändern. Ebenfalls sollte dabei überprüft werden, ob eine Re-Besiedelung in Explantatkulturtechnik einen unterschiedlichen Effekt auf die Stammzellerhaltung im Limbus ausübt. Auch die Zellschichtdicke sollte in kommenden Studien miterfasst werden, damit differenziert werden kann, ob ein ALI zu einer stärkeren Abschilferung des Epithels führt als eine konventionelle Kultivierung. Abschließend müssen die Experimente in zukünftigen Arbeiten in ein *in vivo* Tiermodell überführt werden, um gesicherte Kenntnisse über sie als mögliche Transplantationsmatrix bei bilateraler LSCD gewinnen und den Einfluss des Limbus auf die LESC *in vivo* untersuchen zu können.

4.9 Limitationen

Aus der beschriebenen herangezogenen Arbeitsweise ergeben sich Limitationen dieser Arbeit. Diese sind möglicherweise ein Grund, warum nicht alle gewonnenen Ergebnisse eine statistische Signifikanz, sondern zeigen in einigen Bereichen nur Tendenzen aufzeigen. Als größte Einschränkung gilt hierbei die geringe Probenanzahl. Die Begrenzung auf je drei humane und drei porcine Korneae pro Beobachtungszeitraum wurde gewählt, da es sich bei dieser Arbeit um eine Pilotstudie handelt. Die Anzahl von $n = 3$ humane und porcine Korneae pro Beobachtungszeitraum erschien allerdings genug, um erste wegweisende Ergebnisse zu erzielen und Konsequenzen für die Planung von Fortsetzungsstudien zu ziehen. Unter Zusammenschau der verschiedenen Experimente wurden wichtige Trends aufgezeigt, es sollten allerdings größer angelegte weiterführende Studien zur Überprüfung der Ergebnisse durchgeführt werden. Insbesondere die Untersuchung des Erhalts der Stammzeleigenschaften erscheint hier sinnvoll.

Eine weitere Limitation ist das heterogene Kollektiv. Studienrelevante Unterschiede und Korrelationen wurden von individuellen Unterschieden überlagert und waren daher nicht eindeutig erkennbar. So konnten wegen logistischer Gründe beispielsweise die Spenderkorneae nicht von Leichnamen einer definierten Altersgruppe verwendet werden, um eine Beeinflussung des Alters der Kornea und des Limbus auf deren Fähigkeit zur Regulation der Stammzellen zu minimieren. So fanden Gogola et al. heraus, dass die Kollagenmorphologie in der Sklera und Kornea im Alter abnimmt, sich die Morphologie des Limbus ändert und auch die mechanische Belastbarkeit im Alter variiert [171]. Dahingegen wurde von Consejo et al. konträr dazu beobachtet, dass der Limbus zwar individuell abhängig geformt ist, jedoch das Alter keinen Einfluss auf dessen Morphologie hat [172]. Für eine

differenzierte Untersuchung des dezellularisierten Limbus als idealen Wachstumsuntergrund, sollte das Alter der Spenderkorneae miteinbezogen werden, um ein homogeneres Spenderkollektiv zu erzielen. Schwankungen sind dennoch nicht komplett vermeidbar, da es sich bei porcinen und humanen Korneae um biologisches Material handelt.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Schünke, M., E. Schulte, and U. Schumacher, *Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie*. 2012, Stuttgart: Georg Thieme Verlag. 158-159.
2. Gonzalez, G., et al., *Limbal stem cells: identity, developmental origin, and therapeutic potential*. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol, 2018. **7**(2).
3. Stepp, M.A., et al., *Corneal epithelial cells function as surrogate Schwann cells for their sensory nerves*. Glia, 2017. **65**(6): p. 851-863.
4. Huang, A.J. and S.C. Tseng, *Corneal epithelial wound healing in the absence of limbal epithelium*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1991. **32**(1): p. 96-105.
5. Avunduk, A.M. and Y. Tekelioglu, *Therapeutic use of limbal stem cells*. Curr Stem Cell Res Ther, 2006. **1**(2): p. 231-8.
6. Schermer, A., S. Galvin, and T.T. Sun, *Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells*. J Cell Biol, 1986. **103**(1): p. 49-62.
7. Davanger, M. and A. Evensen, *Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium*. Nature, 1971. **229**(5286): p. 560-1.
8. Secker, G.A. and J.T. Daniels, *Corneal epithelial stem cells: deficiency and regulation*. Stem Cell Rev, 2008. **4**(3): p. 159-68.
9. Schlotzer-Schrehardt, U., U. Freudenberg, and F.E. Kruse, *[The emerging technology of tissue engineering : Focus on stem cell niche]*. Ophthalmologe, 2017. **114**(4): p. 327-340.
10. Ordonez, P. and N. Di Girolamo, *Limbal epithelial stem cells: role of the niche microenvironment*. Stem Cells, 2012. **30**(2): p. 100-7.
11. Dziasko, M.A. and J.T. Daniels, *Anatomical Features and Cell-Cell Interactions in the Human Limbal Epithelial Stem Cell Niche*. Ocul Surf, 2016. **14**(3): p. 322-30.
12. Li, W., et al., *Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus*. Cell Res, 2007. **17**(1): p. 26-36.
13. Eberwein, P. and T. Reinhard, *[Perspectives and current state in limbal stem cell transplantation]*. Ophthalmologe, 2011. **108**(9): p. 840-5.
14. Schlotzer-Schrehardt, U., et al., *Characterization of extracellular matrix components in the limbal epithelial stem cell compartment*. Exp Eye Res, 2007. **85**(6): p. 845-60.
15. Haagdoorens, M., et al., *Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 9798374.
16. Goldberg, M.F. and A.J. Bron, *Limbal palisades of Vogt*. Trans Am Ophthalmol Soc, 1982. **80**: p. 155-71.
17. Bizheva, K., et al., *In-vivo imaging of the palisades of Vogt and the limbal crypts with sub-micrometer axial resolution optical coherence tomography*. Biomed Opt Express, 2017. **8**(9): p. 4141-4151.
18. Cotsarelis, G., et al., *Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells*. Cell, 1989. **57**(2): p. 201-9.
19. Thoft, R.A. and J. Friend, *The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1983. **24**(10): p. 1442-3.
20. Castro-Munozledo, F., *Review: corneal epithelial stem cells, their niche and wound healing*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1600-13.

21. Tseng, S.C., *Concept and application of limbal stem cells*. Eye (Lond), 1989. **3 (Pt 2)**: p. 141-57.
22. Boulton, M. and J. Albon, *Stem cells in the eye*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36(4)**: p. 643-57.
23. Li, J., et al., *Identification for Differential Localization of Putative Corneal Epithelial Stem Cells in Mouse and Human*. Sci Rep, 2017. **7(1)**: p. 5169.
24. Dua, H.S., et al., *Stem cell differentiation and the effects of deficiency*. Eye (Lond), 2003. **17(8)**: p. 877-85.
25. Meller, D. and H. Thomasen, [*Limbal epithelial stem cell transplantation : Current state and perspectives*]. Ophthalmologe, 2017. **114(4)**: p. 298-306.
26. Secker, G.A. and J.T. Daniels, *Limbal epithelial stem cells of the cornea*, in *StemBook*. 2008: Cambridge (MA).
27. Secker, G.A. and J.T. Daniels. *Limbal epithelial stemm cells of the cornea. Figure 3 The human limbus*. StemBook 2008 [cited 2020 04.12]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27054/figure/limbalepithelialstemcellsofthecornea.F3/?report=objectonly>.
28. Joe, A.W. and S.N. Yeung, *Concise review: identifying limbal stem cells: classical concepts and new challenges*. Stem Cells Transl Med, 2014. **3(3)**: p. 318-22.
29. Pellegrini, G., et al., *p63 identifies keratinocyte stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98(6)**: p. 3156-61.
30. Di Iorio, E., et al., *Isoforms of DeltaNp63 and the migration of ocular limbal cells in human corneal regeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102(27)**: p. 9523-8.
31. Notara, M., S. Schrader, and J.T. Daniels, *The porcine limbal epithelial stem cell niche as a new model for the study of transplanted tissue-engineered human limbal epithelial cells*. Tissue Eng Part A, 2011. **17(5-6)**: p. 741-50.
32. Chen, Z., et al., *Characterization of putative stem cell phenotype in human limbal epithelia*. Stem Cells, 2004. **22(3)**: p. 355-66.
33. Zhou, S., et al., *The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype*. Nat Med, 2001. **7(9)**: p. 1028-34.
34. Yoshida, S., et al., *Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47(11)**: p. 4780-6.
35. Schlotzer-Schrehardt, U. and F.E. Kruse, *Identification and characterization of limbal stem cells*. Exp Eye Res, 2005. **81(3)**: p. 247-64.
36. Espana, E.M., et al., *Characterization of corneal pannus removed from patients with total limbal stem cell deficiency*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45(9)**: p. 2961-6.
37. Lindberg, K., et al., *In vitro propagation of human ocular surface epithelial cells for transplantation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993. **34(9)**: p. 2672-9.
38. Dua, H.S. and A. Azuara-Blanco, *Limbal stem cells of the corneal epithelium*. Surv Ophthalmol, 2000. **44(5)**: p. 415-25.
39. Nubile, M., et al., *In vivo confocal microscopy in diagnosis of limbal stem cell deficiency*. Am J Ophthalmol, 2013. **155(2)**: p. 220-32.
40. Meller, D., H. Thomasen, and K.P. Steuhl, [*Ocular surface reconstruction in limbal stem cell deficiency : Transplantation of cultivated limbal epithelium*]. Ophthalmologe, 2012. **109(9)**: p. 863-8.
41. Pellegrini, G., et al., *Epithelial stem cells in corneal regeneration and epidermal gene therapy*. J Pathol, 2009. **217(2)**: p. 217-28.

42. Prinz, J., et al., [*Simple limbal epithelial transplantation (SLET) : A simple technique for the treatment of unilateral complete limbal stem cell deficiency. Video article*]. *Ophthalmologe*, 2021. **118**(4): p. 404-412.
43. Jackson, C.J., et al., *Simple limbal epithelial transplantation: Current status and future perspectives*. *Stem Cells Transl Med*, 2020. **9**(3): p. 316-327.
44. Vazirani, J., et al., *Autologous simple limbal epithelial transplantation for unilateral limbal stem cell deficiency: multicentre results*. *Br J Ophthalmol*, 2016. **100**(10): p. 1416-20.
45. Basu, S., et al., *Simple Limbal Epithelial Transplantation: Long-Term Clinical Outcomes in 125 Cases of Unilateral Chronic Ocular Surface Burns*. *Ophthalmology*, 2016. **123**(5): p. 1000-10.
46. Djalilian, A.R., et al., *Survival of donor epithelial cells after limbal stem cell transplantation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005. **46**(3): p. 803-7.
47. Kenyon, K.R. and S.C. Tseng, *Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders*. *Ophthalmology*, 1989. **96**(5): p. 709-22; discussion 722-3.
48. Miri, A., B. Al-Deiri, and H.S. Dua, *Long-term outcomes of autolimbal and allolimbal transplants*. *Ophthalmology*, 2010. **117**(6): p. 1207-13.
49. Pellegrini, G., et al., *Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium*. *Lancet*, 1997. **349**(9057): p. 990-3.
50. Tsai, R.J., L. Li, and J. Chen, *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells(1)*. *Am J Ophthalmol*, 2000. **130**(4): p. 543.
51. Koizumi, N., et al., *Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. **41**(9): p. 2506-13.
52. Agency, E.M., *Holoclar - Ex vivo expandierte autologe menschliche Hornhautepithelzellen, die Stammzellen erhalten, in Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit*. 2015, European Medicines Agency: Amsterdam.
53. Use, C.f.M.P.f.H., *Assessment report - Holoclar*. 2014, European Medicines Agency: London.
54. Kolli, S., et al., *Loss of corneal epithelial stem cell properties in outgrowths from human limbal explants cultured on intact amniotic membrane*. *Regen Med*, 2008. **3**(3): p. 329-42.
55. Meller, D., R.T. Pires, and S.C. Tseng, *Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures*. *Br J Ophthalmol*, 2002. **86**(4): p. 463-71.
56. Meller, D. and F. Kruse, [*Ex-vivo expansion of cornea stem cells. Experimental principles and initial clinical results*]. *Ophthalmologe*, 2001. **98**(9): p. 811-7.
57. Pauklin, M., et al., *Midterm results of cultivated autologous and allogeneic limbal epithelial transplantation in limbal stem cell deficiency*. *Dev Ophthalmol*, 2010. **45**: p. 57-70.
58. Grueterich, M., E.M. Espana, and S.C. Tseng, *Ex vivo expansion of limbal epithelial stem cells: amniotic membrane serving as a stem cell niche*. *Surv Ophthalmol*, 2003. **48**(6): p. 631-46.
59. Levis, H. and J.T. Daniels, *New technologies in limbal epithelial stem cell transplantation*. *Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(5): p. 593-7.
60. Menzel-Severing, J., et al., [*Limbal stem cells and their niche: implications for bioengineered tissue constructs*]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2012. **229**(12): p. 1191-7.
61. Sorgenfrei, T., *Transplantate aus humanem Gewebe*. *Pharmazeutische Zeitung*, 2015. **37/2015**.

62. Cheng, J., et al., *Long-term outcome of allogeneic cultivated limbal epithelial transplantation for symblepharon caused by severe ocular burns*. BMC Ophthalmol, 2017. **17**(1): p. 8.
63. Prabhasawat, P., et al., *Efficacy of cultivated corneal epithelial stem cells for ocular surface reconstruction*. Clin Ophthalmol, 2012. **6**: p. 1483-92.
64. Rama, P., et al., *Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency*. Transplantation, 2001. **72**(9): p. 1478-85.
65. Higa, K., et al., *Proliferation and differentiation of transplantable rabbit epithelial sheets engineered with or without an amniotic membrane carrier*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(2): p. 597-604.
66. Han, B., et al., *A fibrin-based bioengineered ocular surface with human corneal epithelial stem cells*. Cornea, 2002. **21**(5): p. 505-10.
67. Liu, Y., et al., *A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(5): p. 1869-75.
68. Dravida, S., et al., *A biomimetic scaffold for culturing limbal stem cells: a promising alternative for clinical transplantation*. J Tissue Eng Regen Med, 2008. **2**(5): p. 263-71.
69. Abou Neel, E.A., et al., *Use of multiple unconfined compression for control of collagen gel scaffold density and mechanical properties*. Soft Matter, 2006. **2**(11): p. 986-992.
70. Levis, H.J., et al., *Tissue Engineering the Cornea: The Evolution of RAFT*. J Funct Biomater, 2015. **6**(1): p. 50-65.
71. Ma, D.H., et al., *Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn*. Eye (Lond), 2009. **23**(6): p. 1442-50.
72. Nakamura, T., et al., *The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(1): p. 106-16.
73. Baylis, O., et al., *13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes*. J Cell Biochem, 2011. **112**(4): p. 993-1002.
74. Polisetti, N., et al., *A decellularized human corneal scaffold for anterior corneal surface reconstruction*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 2992.
75. Shortt, A.J., et al., *Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results*. Surv Ophthalmol, 2007. **52**(5): p. 483-502.
76. Rama, P., et al., *Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration*. N Engl J Med, 2010. **363**(2): p. 147-55.
77. Spaniol, K., et al., *Generation and characterisation of decellularised human corneal limbus*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2018. **256**(3): p. 547-557.
78. Eslani, M., et al., *Late Acute Rejection After Allograft Limbal Stem Cell Transplantation: Evidence for Long-Term Donor Survival*. Cornea, 2017. **36**(1): p. 26-31.
79. Atallah, M.R., et al., *Limbal stem cell transplantation: current perspectives*. Clin Ophthalmol, 2016. **10**: p. 593-602.
80. Lang, S.J., et al., *Long-term results of allogenic penetrating limbo-keratoplasty: 20 years of experience*. Eye (Lond), 2017. **31**(3): p. 372-378.
81. Arenas-Herrera, J.E., et al., *Decellularization for whole organ bioengineering*. Biomed Mater, 2013. **8**(1): p. 014106.
82. Biedermann, T., E. Reichmann, and C. Schiestl, *Hautersatz - Tissue Engineering*, in *Plastische Chirurgie bei Kindern und Jugendlichen*, C. Schiestl, et al., Editors. 2017, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 191 - 222.

83. Atala, A., et al., *Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty*. *Lancet*, 2006. **367**(9518): p. 1241-6.
84. Atala, A., *Engineering organs*. *Curr Opin Biotechnol*, 2009. **20**(5): p. 575-92.
85. El-Kassaby, A.W., et al., *Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix*. *J Urol*, 2003. **169**(1): p. 170-3; discussion 173.
86. Black, A.F., et al., *In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent*. *FASEB J*, 1998. **12**(13): p. 1331-40.
87. Bourget, J.M., et al., *Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering*. *Biomaterials*, 2012. **33**(36): p. 9205-13.
88. Linke, K., et al., *Engineered liver-like tissue on a capillarized matrix for applied research*. *Tissue Eng*, 2007. **13**(11): p. 2699-707.
89. Lee, W., et al., *A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity*. *Int J Ophthalmol*, 2014. **7**(4): p. 587-93.
90. Deutzmann, R. and P. Bruckner, *Extrazelluläre Matrix – Struktur und Funktion*, in *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, P. Heinrich, M. Müller, and L. Graeve, Editors. 2014, Springer: Berlin, Heidelberg.
91. Porzionato, A., et al., *Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(12).
92. DuFort, C.C., M.J. Paszek, and V.M. Weaver, *Balancing forces: architectural control of mechanotransduction*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(5): p. 308-19.
93. Ross, A.M., et al., *Physical aspects of cell culture substrates: topography, roughness, and elasticity*. *Small*, 2012. **8**(3): p. 336-55.
94. Greiner, A., M. Bachmann, and M. Bastmeyer. *Einfluss der Dreidimensionalität von Substraten auf die Zellkultur*. 2014; Available from: <https://analyticalscience.wiley.com/do/10.1002/gitfach.11520>.
95. Tudorache, I., et al., *Decellularized aortic homografts for aortic valve and aorta ascendens replacement*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016. **50**(1): p. 89-97.
96. Sarikouch, S., et al., *Decellularized fresh homografts for pulmonary valve replacement: a decade of clinical experience*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2016. **50**(2): p. 281-90.
97. Zheng, T. and J. Xu, *Age-related changes of human limbus on in vivo confocal microscopy*. *Cornea*, 2008. **27**(7): p. 782-6.
98. Börgel, M., *Zurück zum Licht dank Augenhornhautspende*. 2019, Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation: Hannover.
99. Schulz, A., *Wie lange leben Rind, Schwein, Schaf und Huhn?* 2020, Bundesinformationszentrum Landwirtschaft: Bonn.
100. Walters, E.M., et al., *Completion of the swine genome will simplify the production of swine as a large animal biomedical model*. *BMC Med Genomics*, 2012. **5**: p. 55.
101. Duscher, S., *Vergleichende Genomanalyse bei Mensch und Schwein am Beispiel ausgewählter syntenischer Regionen des humanen Chromosoms 6*, G.-A.-U.z. Göttingen, Editor. 2001: Göttingen.
102. von Westphalen, G., F. Antwerpes, and B. Fink. *Mensch*. 2020 07.05.2020; Available from: <https://flexikon.doccheck.com/de/Mensch>.
103. Ahrens, S. *Anzahl der Schweineschlachtungen in Deutschland in den Jahren 1993 bis 2019*. Schweineschlachtungen in Deutschland bis 2019 2020; Available from: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/459142/umfrage/schweineschlachtungen-in-deutschland/>.

104. Zeng, Y., et al., *A comparison of biomechanical properties between human and porcine cornea*. J Biomech, 2001. **34**(4): p. 533-7.
105. Hara, H. and D.K. Cooper, *Xenotransplantation--the future of corneal transplantation?* Cornea, 2011. **30**(4): p. 371-8.
106. Grieve, K., et al., *Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche*. Exp Eye Res, 2015. **140**: p. 75-84.
107. aerzteblatt.de. *Xenotransplantation: Mensch lebt seit 3 Tagen mit Schweineherz*. 2022 [01.03.2022].
108. aerzteblatt.de. *Xenotransplantation verwendete von FDA zugelassene Species*. 2021 [cited 2022].
109. Lions Hornhautbank NRW, D. *Aufgaben der Hornhautbank*. 2020; Available from: <https://www.uniklinik-duesseldorf.de/patienten-besucher/klinikeninstitutezentren/klinik-fuer-auge/heilkunde/lions-hornhautbank-nrw/aufgaben-der-hornhautbank>.
110. Roche Applied Science, R., *Cell Proliferation Reagent WST-1. Colorimetric assay (WST-1 based) for the nonradioactive quantification of cell proliferation, cell viability, and cytotoxicity*. Version 16, 2011.
111. Pfaffl, M.W.M., H. H. D., *Quantifizierung der mRNA-Expression von Kandidatengenen in Nutztieren mittels qRT-PCR*. Züchtungskunde. Vol. 78. 2006, Stuttgart: Eugen Ulmer KG. S. 440 - 450.
112. Robert Koch Institut, R., *GBE-Themenheft Blindheit und Sehbehinderung*, in *Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und Destatis*, R. Robert Koch Institut, Editor. 2017: Berlin. p. 10.
113. Kruse, F.E. and D. Meller, *[Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the ocular surface]*. Ophthalmologe, 2001. **98**(9): p. 801-10.
114. Konomi, K., et al., *Long-term results of amniotic membrane transplantation for partial limbal deficiency*. Cornea, 2013. **32**(8): p. 1110-5.
115. Yazdanpanah, G., et al., *Strategies for reconstructing the limbal stem cell niche*. Ocul Surf, 2019. **17**(2): p. 230-240.
116. Levis, H.J., R.A. Brown, and J.T. Daniels, *Plastic compressed collagen as a biomimetic substrate for human limbal epithelial cell culture*. Biomaterials, 2010. **31**(30): p. 7726-37.
117. Brown, K.D., et al., *Plasma polymer-coated contact lenses for the culture and transfer of corneal epithelial cells in the treatment of limbal stem cell deficiency*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(3-4): p. 646-55.
118. Deshpande, P., et al., *Using poly(lactide-co-glycolide) electrospun scaffolds to deliver cultured epithelial cells to the cornea*. Regen Med, 2010. **5**(3): p. 395-401.
119. Bray, L.J., et al., *Human corneal epithelial equivalents constructed on Bombyx mori silk fibroin membranes*. Biomaterials, 2011. **32**(22): p. 5086-91.
120. Sitalakshmi, G., et al., *Ex vivo cultivation of corneal limbal epithelial cells in a thermoreversible polymer (Mebiol Gel) and their transplantation in rabbits: an animal model*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(2): p. 407-15.
121. Lynch, A.P. and M. Ahearne, *Strategies for developing decellularized corneal scaffolds*. Exp Eye Res, 2013. **108**: p. 42-7.
122. Mertsch, S., et al., *Decellularized human corneal stromal cell sheet as a novel matrix for ocular surface reconstruction*. J Tissue Eng Regen Med, 2020. **14**(9): p. 1318-1332.

123. He, Z., et al., *Cutting and Decellularization of Multiple Corneal Stromal Lamellae for the Bioengineering of Endothelial Grafts*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2016. **57**(15): p. 6639-6651.
124. Yam, G.H., et al., *Decellularization of human stromal refractive lenticles for corneal tissue engineering*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26339.
125. Gilpin, A. and Y. Yang, *Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 9831534.
126. Sarikouch, S., et al., *Aortenklappenersatz: Therapieoptionen für junge Patienten*. Deutsches Ärzteblatt, 2015. **112**.
127. Parmaksiz, M., et al., *Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine*. Biomed Mater, 2016. **11**(2): p. 022003.
128. Zhang, Z., et al., *Bioengineered multilayered human corneas from discarded human corneal tissue*. Biomed Mater, 2015. **10**(3): p. 035012.
129. Gilbert, T.W., T.L. Sellaro, and S.F. Badylak, *Decellularization of tissues and organs*. Biomaterials, 2006. **27**(19): p. 3675-83.
130. Badylak, S.F., *Decellularized allogeneic and xenogeneic tissue as a bioscaffold for regenerative medicine: factors that influence the host response*. Ann Biomed Eng, 2014. **42**(7): p. 1517-27.
131. Badylak, S.F., *The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction*. Semin Cell Dev Biol, 2002. **13**(5): p. 377-83.
132. Chen, Y., et al., *Receptor-mediated cell mechanosensing*. Mol Biol Cell, 2017. **28**(23): p. 3134-3155.
133. Kueri, S., et al., *Einsatz biologischer Herzklappen - Prothesentypen, Haltbarkeit und Komplikationen*. Deutsches Ärzteblatt 2019. **25**: p. 423-430.
134. Hammer, C., *Zu den Möglichkeiten der Xenotransplantation*. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz, 2002. **45**: p. 801 - 806.
135. Sandrin, M.S. and I.F. McKenzie, *Gal alpha (1,3)Gal, the major xenoantigen(s) recognised in pigs by human natural antibodies*. Immunol Rev, 1994. **141**: p. 169-90.
136. Galili, U., *The alpha-gal epitope and the anti-Gal antibody in xenotransplantation and in cancer immunotherapy*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(6): p. 674-86.
137. Lai, L., et al., *Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1089-92.
138. Cooper, D.K. and R. Wagner, *Nonhuman Primates in Biomedical Research (Second Edition)*. Chapter 16 - Xenotransplantation. Vol. Volume 1: Biology and Management. 2012, American College of Laboratory Animal Medicine: Academic Press.
139. Hoppe, J.-D. and K.-F. Sewing, *Stellungnahme des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer zur Xenotransplantation*, in *Deutsches Ärzteblatt*. 1999. p. 1920 - 1926.
140. Reichart, B., *Xenogene Zell- und Organtransplantationen - vom Labor in die Klinik*. Münchener Theologische Zeitschrift, 2015. **65**.
141. Kshersagar, J., et al., *Decellularized amnion scaffold with activated PRP: a new paradigm dressing material for burn wound healing*. Cell Tissue Bank, 2018. **19**(3): p. 423-436.
142. Rios, A.R., et al., *Public attitude toward xenotransplantation: opinion survey*. Transplant Proc, 2004. **36**(10): p. 2901-5.
143. Cowan, P.J., et al., *Renal xenografts from triple-transgenic pigs are not hyperacutely rejected but cause coagulopathy in non-immunosuppressed baboons*. Transplantation, 2000. **69**(12): p. 2504-15.

144. Beckmann, J.P., G. Brem, and F.W. Eigler, *Xenotransplantation von Zellen, Geweben und Organen*. Wissenschaftliche Entwicklungen und ethisch-rechtliche Implikationen. Vol. 8. 2000, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
145. O'Neill, J.D., et al., *Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering*. *Ann Thorac Surg*, 2013. **96**(3): p. 1046-55; discussion 1055-6.
146. Fu, Y., et al., *Reconstruction of a tissue-engineered cornea with porcine corneal acellular matrix as the scaffold*. *Cells Tissues Organs*, 2010. **191**(3): p. 193-202.
147. Choi, J.S., et al., *Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma*. *Biomaterials*, 2010. **31**(26): p. 6738-45.
148. Tsai, R.J., L.M. Li, and J.K. Chen, *Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(2): p. 86-93.
149. Selver, O.B., et al., *ABCG2-dependent dye exclusion activity and clonal potential in epithelial cells continuously growing for 1 month from limbal explants*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(7): p. 4330-7.
150. Zhang, X., et al., *Comparison of cell-suspension and explant culture of rabbit limbal epithelial cells*. *Exp Eye Res*, 2005. **80**(2): p. 227-33.
151. Kim, H.S., et al., *Phenotypic characterization of human corneal epithelial cells expanded ex vivo from limbal explant and single cell cultures*. *Exp Eye Res*, 2004. **79**(1): p. 41-9.
152. Watanabe, K., et al., *Human limbal epithelium contains side population cells expressing the ATP-binding cassette transporter ABCG2*. *FEBS Lett*, 2004. **565**(1-3): p. 6-10.
153. Shafiq, M.A., et al., *Decellularized human cornea for reconstructing the corneal epithelium and anterior stroma*. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012. **18**(5): p. 340-8.
154. Llames, S., et al., *Feeder Layer Cell Actions and Applications*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. **21**(4): p. 345-53.
155. Zhang, R., et al., *A thermoresponsive and chemically defined hydrogel for long-term culture of human embryonic stem cells*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 1335.
156. Barker, S.L., PJ, *Method of production and control of a commercial tissue culture surface*. *Journal of Tissue Culture Methods*, 1994. **16**: p. 151-153.
157. Curtis, A.S., et al., *Adhesion of cells to polystyrene surfaces*. *J Cell Biol*, 1983. **97**(5 Pt 1): p. 1500-6.
158. Janin-Manificat, H., et al., *Development of ex vivo organ culture models to mimic human corneal scarring*. *Mol Vis*, 2012. **18**: p. 2896-908.
159. Liu, J.L., BD; Liu, A; Schwab, IR; Oliveira, LA; Rosenblatt, MI, *Silk fibroin as a biomaterial substrate for corneal epithelial cell sheet generation*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012. **53**: p. 4130-4138.
160. Pohl, C.B., M; Hermanns, I, *Einfluss auf Barriere und Transport in verschiedenen Ko-Kulturen des proximalen respiratorischen Systems*. *Pneumologie*, 2009. **63**.
161. Wang, Y., *Air-liquid interface cultivation of corneal epithelium constructed in vitro*. *ResearchGate*, 2004. **8**: p. 6426-6428.
162. Lavker, R.M., S.C. Tseng, and T.T. Sun, *Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle*. *Exp Eye Res*, 2004. **78**(3): p. 433-46.
163. Wentges, M., *Isolierung, Kultivierung und magnetische Separation von Vorläuferzellen aus humanem respiratorischem Epithel*, M.F.d.C.-U. Berlin, Editor. 2004: Berlin.
164. Huang, M., et al., *Using acellular porcine limbal stroma for rabbit limbal stem cell microenvironment reconstruction*. *Biomaterials*, 2011. **32**(31): p. 7812-21.
165. Sun, X. and P.D. Kaufman, *Ki-67: more than a proliferation marker*. *Chromosoma*, 2018. **127**(2): p. 175-186.

166. Hauss, J., *Organtransplantation - zum gegenwärtigen Stand*, in *Ärzteblatt Sachsen*. 2015, Sächsische Landesärztekammer und Ärzteblatt Sachsen: Dresden. p. 456.
167. Schaft, T., *Gewebspende als Voraussetzung moderner Gewebemedizin*, in *Ärzteblatt Sachsen*. 2015, Sächsische Landesärztekammer und Ärzteblatt Sachsen: Dresden. p. 491-493.
168. Gewebebank Mecklenburg-Vorpommern gGmbH, G.-V. *Die Herstellung von Gewebetransplantaten - Was macht eine Gewebebank?* 2018; Available from: <https://www.gbm-v.de/wegweiser/gewebetransplantate/>.
169. Bundesregierung, *Unterrichtung durch die Bundesregierung - Dritter Bericht der Bundesregierung über die Situation der Versorgung der Bevölkerung mit Gewebe und Gewebezubereitungen*, in *Deutscher Bundestag 19. Wahlperiode*. 2018: Berlin. p. 33.
170. Deutsche Stiftung Organtransplantation, D. *Statistiken zur Organspende für Deutschland und Europa. Stand 2019*. 2020; Available from: <https://www.organspende-info.de/zahlen-und-fakten/statistiken.html>
171. Gogola, A., et al., *Spatial Patterns and Age-Related Changes of the Collagen Crimp in the Human Cornea and Sclera*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018. **59**(7): p. 2987-2998.
172. Consejo, A., et al., *Mean shape of the human limbus*. *J Cataract Refract Surg*, 2017. **43**(5): p. 667-672.

6 Anhang

6.1 Geräte

Dampfgarer	Braun (Frankfurt am Main, Germany)
Sicherheitsschrank für Chemikalien	Düperthal (Karlstein, Germany)
Zentrifuge 5424	
Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Pipetten	
Absaugpumpe Vacusafe	Integra (Zizers, Swiss)
Magnetrührer C-MAG HS7	IKA (Staufen, Germany)
Trockenschrank ISO9001	Jouan (Unterhaching, Germany)
Präzisionswaage PCB 1000-2	Kern und Sohn (Balingen, Germany)
Microplate Reader E _{max}	Labsystems (Helsinki, Finland)
Mikroskop DM4000B	
Mikroskopkamera DFC295	Leica (Wetzlar, Germany)
Mikrotom RM2255	
Gefrierschränke	Liebherr (Kirchdorf, Germany)
Tissue Flotation Bath TFB55	
Wärmeplatte ITS40	Medite (Burgdorf, Germany)
Wasserbad	Memmert (Schwabach, Germany)
Paraffineinbettautomat TPS-1 EVO II	Pathisto (Georgsmarienhütte, Germany)
Handstückzähler	Roth (Karlsruhe, Germany)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, United States)
Plate Centrifuge	Star Lab (Hamburg, Germany)
Autoklav VX-95	Systemec (Bergheim, Germany)
7500 Fast Real-Time PCR System	
Entwässerungsautomat Shandon Citadel 1000	
Inkubator HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, United States)
Kühlplatte Shandon Histocentre 3	
Nano-Drop ONEc	
Sterilbank Safety Cabinet Class II	
Zentrifuge Heraeus Megafuge 16	
Kreisschüttler	VWR International (Pennsylvania, United States)

Anhang

Neubauer Zählkammer

pH-Meter pHenomenal

Sicherheitsabzug Secuflow

Waldner (Wangen, Germany)

6.2 Verbrauchsmaterial

Pasteurpipetten

Brand (Wertheim, Germany)

Centrifuge Tube Centristar Cap (15 / 50 ml)

Corning Incorporated (New York, United States)

Serologische Pipetten (5 / 10 / 25 ml)

Multiwell-Platten (6 / 12 / 24 / 48 / 96)

Costar (New York, United States)

Fettstift Dako Pen Code S2002

Dako (Hamburg, Germany)

Deckgläser

Einbettkassetten für Biopsie

Objektträger Starfrost Advanced Adhesive

Engelbrecht (Edermünde, Germany)

Papierfilter für Einbettung

Schwamm für Einbettung

Eppendorfreaktionsgefäße
(0,5 / 1 / 1,5 / 2 ml)

Eppendorf (Hamburg, Germany)

Mikrotomklinge R35

Feather (Osaka, Japan)

Skalpell No 10

Sterilfilter

Roth (Karlsruhe, Germany)

Petrischalen

Pipettenspitzen
(10 / 100 / 200 / 1000 µl)

Sarstedt (Nümbrecht, Germany)

Zellkulturflaschen, Standard TC-Beschichtung
(T75 / T175)

Spritzen (20 ml)

Sigma Aldrich (Missouri, United States)

6.3 Mittelwertvergleiche der Schichtanzahl

Die nachstehende Tabelle bezieht sich auf das Kapitel „Mehrschichtigkeit des neuen kornealen Epithels“ (Kap. 3.3). Um zu überprüfen, ob eine Veränderung der mittleren Schichtanzahl des Epithels zwischen zwei Untersuchungszeitpunkten vorliegt, wurden Mittelwertvergleiche mittels t-Test durchgeführt. Dabei wurden Veränderungen zwischen den Tagen D3 und D7, zwischen D7 und D21 sowie D3 und D21 untersucht. Unterschieden wurde

dabei zwischen der Spezies der Kornea, der Kultivierungsart sowie der Lokalisation der Zellen (Kap. 2.2.5.1, Kap. 2.2.5.2).

Tabelle 7: Mittelwertvergleiche der Schichtanzahl re-epithelialisierter Korneae

Spezies	Kultivierungsart	Lokalisation	Zeitpunkt	Df	p
Human	Konventionell	Limbus	D3 → D7	t(10) = -2,702	,022
		Zentrale Kornea		t(10) = -,760	,465
		Limbus	D7 → D21	t(10) = ,418	,685
		Zentrale Kornea		t(10) = ,520	,614
		Limbus	D3 → D21	t(10) = -2,423	,036
		Zentrale Kornea		t(10) = -,299	,771
	Luft-Flüssigkeits-Grenze	Limbus	D3 → D7	t(10) = -2,314	,043
		Zentrale Kornea		t(10) = -1,871	,091
		Limbus	D7 → D21	t(10) = -,847	,417
		Zentrale Kornea		t(10) = ,697	,502
		Limbus	D3 → D21	t(10) = -2,274	,046
		Zentrale Kornea		t(10) = -2,331	,042
Porcin	Konventionell	Limbus	D3 → D7	t(10) = -1,360	,204
		Zentrale Kornea		t(10) = -1,459	,175
		Limbus	D7 → D21	t(10) = ,847	,417
		Zentrale Kornea		t(10) = ,542	,599
		Limbus	D3 → D21	t(10) = -1,362	,203
		Zentrale Kornea		t(10) = -2,169	,055
	Luft-Flüssigkeits-Grenze	Limbus	D3 → D7	t(8) = -,945	,373
		Zentrale Kornea		t(8) = -1,368	,208
		Limbus	D7 → D21	t(10) = -1,4	,192
		Zentrale Kornea		t(10) = ,271	,792
		Limbus	D3 → D21	t(8) = -1,594	,150
		Zentrale Kornea		t(8) = -2,154	,063

Dargestellt sind die Mittelwertvergleiche der Schichtanzahl des ausgesäten Epithels auf einer dezellularisierten humane oder porcinen Kornea. Dabei wurden die Zellschichten in den Lokalisationen Limbus und Zentrale Kornea an Tag 3, Tag 7 und Tag 21 ausgezählt. Unterschieden wurde dabei die Kultivierung der re-epithelialisierten Korneae in einer konventionellen Kultivierung und in einer Luft-Flüssigkeits-Grenze. Verglichen wurden hier die Schichtanzahl zwischen Tag 3 und Tag 7, zwischen Tag 7 und 21 sowie zwischen Tag 3 und Tag 21.; $p \leq ,05$

6.4 Einflussfaktor auf die Proteinexpression von LESC nach Re-Epithelialisierung

Auf Tabelle 8 wird in Kapitel 3.4.1 Bezug genommen, sie basiert auf dem Experiment „Immunhistochemische Färbung“ (Kap. 2.2.3.4). Eine multiple Regression diente der Detektion von Einflussfaktoren auf die Expression der Progenitorzellmarker ABCG2, p63 α und Cytokeratin 15, des Proliferationsmarkers Ki67, der Epithelzellmarker Cytokeratin 12 und Cytokeratin 3 sowie des Apoptosemarkers Caspase 3. Einbezogen wurden die Faktoren Spezies, Kultivierungsart, Kultivierungsdauer und Lokalisation (Kap. 2.2.5.1, Kap. 2.2.5.2). Es konnten keine signifikanten Einflüsse nachgewiesen werden, bis auf eine negative Wirkung der Kultivierungsdauer auf die Expression von Ki67 ($\beta = -,154$, $p < ,001$) und einen Einfluss der Spezies des Wachstumsuntergrund auf Cytokeratin 3 ($\beta = -,159$, $p = ,002$).

Tabelle 8: Einflussfaktor auf die Proteinexpression von LESC nach Re-Epithelialisierung

Antikörper	Outcomevariable	Regressionskoeffizient B	p	95%-KI
ABCG2	Spezies	-,030	,706	[-,188; ,128]
	Kultivierungsart	,047	,554	[-,111; ,205]
	Kultivierungsdauer	,067	,176	[-,031; ,164]
	Lokalisation	-,087	,273	[-,245; ,071]
p63 α	Spezies	,056	,325	[-,056; ,168]
	Kultivierungsart	,073	,196	[-,039; ,185]
	Kultivierungsdauer	,011	,751	[-,058; ,081]
	Lokalisation	-,041	,472	[-,152; ,071]
Cytokeratin 15	Spezies	-,142	,106	[-,315; ,031]
	Kultivierungsart	-,054	,534	[-,227; ,119]
	Kultivierungsdauer	,016	,763	[-,090; ,123]
	Lokalisation	-,041	,637	[-,213; ,132]
Ki67	Spezies	,037	,582	[-,095; ,168]
	Kultivierungsart	,015	,816	[-,116; ,147]
	Kultivierungsdauer	-,155	< ,001	[-,237; -,074]
	Lokalisation	-,067	,311	[-,199; ,064]
Cytokeratin 12	Spezies	-,007	,856	[-,080; ,066]
	Kultivierungsart	,032	,383	[-,041; ,105]
	Kultivierungsdauer	,008	,709	[-,037; ,054]
	Lokalisation	,052	,161	[-,021; ,125]

Anhang

Cytokeratin 3	Spezies	-,159	,002	[-,259; -,060]
	Kultivierungsart	,055	,272	[-,044; ,154]
	Kultivierungsdauer	,057	,070	[-,005; ,118]
	Lokalisation	,032	,527	[-,068; ,131]
Caspase 3	Spezies	,013	,208	[-,007; ,033]
	Kultivierungsart	,009	,374	[-,011; ,029]
	Kultivierungsdauer	-,007	,265	[-,020; ,006]
	Lokalisation	,003	,796	[-,018; ,023]

Dargestellt sind die Ergebnisse der multiplen Regressionen auf Basis der Ergebnisse aus Fluoreszenzfärbungen. Die Expression der Marker ABCG2, p63 α , Cytokeratin 15, Ki67, Cytokeratin 12, Cytokeratin 3 und Caspase 3 durch limbale epitheliale Stammzellen, ausgesät auf eine dezellularisierte humane oder porcine Kornea, wurde untersucht. Hierbei wurde der Einfluss der Kultivierungsart (Konventionelle Kultivierung / Luft-Flüssigkeits-Grenze), der Spezies der Kornea (human / porcin), der Kultivierungsdauer (Tag 3 / 7 / 21) und der Lokalisation der Zellen (Limbus / Zentrale Kornea) untersucht. $p \leq ,05$

6.5 Anteile der antikörper-positiven Zellen nach Re-Epithelialisierung

Auf die folgende Tabelle wird in Kapitel 3.4.1 eingegangen. Ihre Daten stammen aus dem Experiment „Immunhistochemische Färbung“ (Kap 2.2.3.4) und behandeln die Marker ABCG2, p63 α , CK 3, 12 und 15 sowie Caspase 3. Die jeweilige Expression wurde abhängig von der Kultivierungsart, der Lokalisation und der Spezies (hier nur Testung des Limbus) mittels Mittelwertvergleichen untersucht. Die Expressionen an Tag 3 und Tag 21 im Limbus wurden verglichen, bei ABCG2 und p63 α zusätzlich unabhängig von der Lokalisation. Signifikante Ergebnisse waren an Tag 7 in der porcinen Probe bei ABCG2 sowie an Tag 21 bei p63 α und in der humanen Probe an Tag 21 bei Cytokeratin 3 in dem Vergleich der Kultivierungsarten zu finden.

Tabelle 9: Vergleich der Anteile der antikörper-positiven Zellen nach Re-Epithelialisierung

Protein	Spezies	Zeitpunkt	Vergleich	Df	p	
ABCG2	Human	D7	Kultivierungsart	t(10) = ,871	,404	
	Porcin			t(10) = -2,693	,023	
	Human	D21		t(10) = -,793	,446	
	Porcin			t(10) = -1,356	,205	
	Human	D3 → D21		t(22) = -,791	,437	
	Human, Limbus			t(10) = ,469	,649	
	Porcin			t(20) = -1,303	,208	
	Porcin, Limbus			t(9) = -1,409	,192	
	Human, Zentrale Kornea			t(10) = -,617	,551	
	Porcin, Zentrale Kornea			t(9) = -,502	,628	
				D7	t(22) = ,147	,884
				D21	t(22) = 1,269	,218
		D7		Spezies (Limbus)	t(10) = ,674	,515
		D21			t(10) = -,634	,540
p63 α	Human	D7	Kultivierungsart	t(10) = ,155	,880	
	Porcin			t(10) = 1,980	,076	
	Human	D21		t(10) = 1,439	,181	
	Porcin			t(10) = -2,570	,011	
	Human	D3 → D21		t(22) = 1,413	,172	
p63 α	Human, Limbus		t(10) = ,668	,519		

Anhang

	Porcin			t(20) = -,909	,374	
	Porcin, Limbus			t(9) = -,580	,576	
	Human, Zentrale Kornea			t(10) = 1,63	,134	
	Porcin, Zentrale Kornea			t(9) = -1,324	,222	
		D7	Lokalisation	t(22) = -,045	,965	
		D21		t(22) = ,402	,691	
		D7	Spezies (Limbus)	t(10) = ,057	,956	
		D21		t(10) = -1,032	,326	
Cytokeratin 15	Human	D7	Kultivierungsart	t(10) = -1,548	,153	
	Porcin			t(10) = 1,565	,149	
	Human	D21		t(10) = ,981	,350	
	Porcin			t(10) = 1,892	,088	
	Human, Limbus			t(10) = -,622	,548	
	Porcin, Limbus		D3 → D21	t(9) = ,220	,831	
	Human, Zentrale Kornea			t(10) = ,482	,640	
	Porcin Zentrale Kornea			t(9) = -,414	,688	
		D7		Lokalisation	t(22) = ,410	,686
		D21	t(22) = ,314		,757	
			D7	Spezies (Limbus)	t(10) = 1,763	,108
			D21		t(10) = ,890	,395
	Ki67	Human	D7	Kultivierungsart	t(10) = -,532	,606
		Porcin			t(10) = ,481	,641
Human		D21	t(10) = -2,348		,041	
Porcin			t(10) = -1,494		,166	
Human, Limbus				t(10) = 1,541	,154	
Porcin, Limbus			D3 → D21	t(9) = 3,292	,009	
Human, Zentrale Kornea				t(10) = ,837	,422	
Porcin, Zentrale Kornea				t(9) = 3,379	,008	
		D7		Lokalisation	t(22) = ,912	,372
		D21	t(22) = -,248		,807	
			D7	Spezies (Limbus)	t(10) = ,105	,919
			D21		t(10) = ,602	,561
		Human	D7	Kultivierungsart	t(10) = 1,378	,198

Anhang

Cytokeratin 12	Porcin			t(10) = -1,0	,341
	Human			t(10) = -1,227	,248
	Porcin	D21		t(10) = -1,914	,085
	Human, Limbus			t(10) = -1,072	,309
	Porcin, Limbus		D3 → D21	t(9) = ,432	,676
	Human, Zentrale Kornea			t(10) = -,745	,473
	Porcin, Zentrale Kornea			t(9) = -,163	,874
		D7		t(22) = -1,048	,306
		D21	Lokalisation	t(22) = -,968	,344
		D7		t(10) = 1,1	,297
		D21	Spezies (Limbus)	t(10) = -,335	,745
	Cytokeratin 3	Human	D7		t(10) = -,314
Porcin				t(10) = 1,123	,288
Human			Kultivierungsart	t(10) = -2,797	,019
Porcin		D21		t(10) = -1,146	,279
Human, Limbus				t(10) = -1,180	,265
Porcin, Limbus			D3 → D21	t(9) = -,663	,524
Human, Zentrale Kornea				t(10) = -,837	,422
Porcin, Zentrale Kornea				t(9) = -1,397	,196
		D7		t(22) = ,381	,707
		D21	Lokalisation	t(22) = -,622	,540
		D7		t(10) = 1,708	,118
		D21	Spezies, (Limbus)	t(10) = 1,466	,173
Caspase 3	Human	D7		t(10) = ,661	,524
	Porcin			t(10) = -1,246	,241
	Human		Kultivierungsart	t(10) = -1,716	,117
	Porcin	D21		t(10) = -,635	,540
	Human, Limbus			t(10) = -1,040	,323
	Porcin, Limbus		D3 → D21	t(9) = 2,103	,065
	Human, Zentrale Kornea			t(10) = -1,760	,109
	Porcin, Zentrale Kornea			t(9) = 1,217	,255
Caspase 3		D7		t(22) = -,536	,598
		D21	Lokalisation	t(22) = -,520	,608

Anhang

D7	Spezies (Limbus)	t(10) = 1,69	,122
D21		t(10) = 1,295	,224

Die angegebenen Werte sind mittels t-Tests erhoben. Es wurde die Proteinexpression von limbalen epithelialen Stammzellen ausgesät auf humane und porcine dezellularisierte Korneae untersucht. Verglichen wurden die Expressionen abhängig von der Kultivierungsart (Konventionell / Luft-Flüssigkeits-Grenze) und der Lokalisation (Limbus / Zentrale Kornea) sowie die limbale Expression abhängig von der Spezies (human / porcin) jeweils am selben Untersuchungstag. Ebenfalls wurde die Expression an den Tagen 3 und 21 miteinander verglichen. $p \leq ,05$

6.6 Einflussfaktoren auf die Genexpression von LESC nach Re-Epithelialisierung

Die folgenden Daten beruhen auf dem Experiment „quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion“ (Kap. 2.2.4.3) und werden in Kapitel 3.4.2 erläutert. Um die Einflussfaktoren für die Genexpression der Gene ABCG2, p63 α -1, p63 α -2, Cytokeratin 15, Bax und Bcl-2 von LESC herauszustellen, welche auf eine dezellularisierte humane oder porcine Kornea beziehungsweise als Kontrolle auf den Kunststoff einer Multi-Well-Platte ausgesät wurden, wurde eine multiple Regression mit den Outcomevariablen Spezies und Kultivierungsdauer durchgeführt (Kap. 2.2.5.1, Kap. 2.2.5.2). Es wurde nachgewiesen, dass die Kultivierungsdauer einen signifikanten Effekt auf die Genexpressionen von ABCG2, p63 α -2, Cytokeratin 15, Bcl-2 und Bax ausübt. Ein Einfluss der dezellularisierten Kornea oder des Kunststoffs auf die Genexpression der LESC konnte nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10: Einflussfaktoren auf die Genexpression von LESC nach Re-Epithelialisierung

	Outcomevariable	Regressions-koef- fizient B	p	95%-KI
ABCG2	Spezies	,039	,947	[-1,156; 1,234]
	Kultivierungsdauer	3,118	<,001	[1,905; 4,332]
p63 α -1	Spezies	-,445	,325	[-1,352; ,462]
	Kultivierungsdauer	,119	,794	[-,802; 1,040]
p63 α -2	Spezies	-,605	,475	[-2,307; 1,098]
	Kultivierungsdauer	2,460	,007	[,731; 4,189]
Cytokeratin 15	Spezies	,496	,302	[-,466; 1,458]
	Kultivierungsdauer	2,108	<,001	[1,131; 3,085]
Bax	Spezies	,352	,599	[-,997; 1,701]
	Kultivierungsdauer	1,8	,012	[,430; 3,169]
Bcl-2	Spezies	,502	,134	[-,163; 1,166]
	Kultivierungsdauer	1,494	<,001	[,819; 2,168]

Dargestellt sind die Ergebnisse der multiplen Regressionen auf Basis der Ergebnisse aus qrt-PCRs. Die Expression der Gene ABCG2, p63 α -1, p63 α -2, Cytokeratin 15, Bax und Bcl-2 von limbalen epithelialen Stammzellen, ausgesät auf eine dezellularisierte humane oder porcine Kornea oder auf Kunststoff, wurde untersucht. Hierbei wurde der Einfluss der Spezies des Untergrundes (human / porcin / Kunststoff) und der Kultivierungsdauer (Tag 3 / 7 / 21) untersucht. $p \leq ,05$

6.7 Genexpressions-Vergleiche von LESC zwischen Proben und Kontrolle

Die folgenden Daten beruhen auf dem Experiment „quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion“ (Kap. 2.2.4.3) und werden in Kapitel 3.4.2 erklärt. Um zu untersuchen, ob sich die dezellularisierte humane und porcine Kornea als Wachstumsuntergrund für *ex-vivo* kultivierte und ausgesäte LESC besser eignen als Kunststoff, wurden Mittelwertvergleiche der Genexpressionen der Proben mit der Kontrolle an den Tagen 3, 7 und 21 durchgeführt. Die Gene ABCG2, p63 α -1, p63 α -2, Cytokeratin 15, Bax und Bcl-2 wurden dafür mittels PCR analysiert. Es wurde nachgewiesen, dass sich die Genexpressionen von LESC zwischen Proben und Kontrollen nicht unterschieden.

Tabelle 11: Mittelwertvergleiche der Genexpression von LESC ausgesät auf dezellularisierte Korneae und auf Kunststoff

Gen	Zeitpunkt	Vergleich	Df	p
ABCG2	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = ,357	,732
	D7		t(7) = -,223	,830
	D21		t(7) = -,089	,932
	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = -,783	,459
	D7		t(7) = ,574	,584
	D21		t(7) = -,672	,523
p63 α -1	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = ,431	,680
	D7		t(7) = ,864	,416
	D21		t(7) = ,884	,406
	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = -,449	,667
	D7		t(7) = -,291	,780
	D21		t(7) = -,344	,741
p63 α -2	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = ,782	,460
	D7		t(7) = ,443	,671
	D21		t(7) = -,034	,974
	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = -,501	,632
	D7		t(7) = ,354	,734
	D21		t(7) = 1,431	,196
Cytokeratin 15	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = ,269	,796
	D7		t(7) = -,768	,468
Cytokeratin 15	D21		t(7) = -,798	,451

Anhang

	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = -1,566	,161
	D7		t(7) = -1,067	,321
	D21		t(7) = -,257	,805
Bcl-2	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = -,664	,528
	D7		t(7) = -2,007	,085
	D21		t(7) = -1,414	,200
	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = ,128	,902
	D7		t(7) = -1,438	,193
	D21		t(7) = -,889	,404
Bax	D3	Humane Probe / Kontrolle	t(7) = ,792	,454
	D7		t(7) = -,593	,572
	D21		t(7) = -,023	,983
	D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(7) = -1,925	,096
	D7		t(7) = -1,035	,335
	D21		t(7) = -2,168	,067

Dargestellt sind die Mittelwertvergleiche der C_T-Werte im Rahmen von qrt-PCRs. Untersucht wurden die Gene ABCG2, p63 α -1, p63 α -2, Cytokeratin 15, Bcl-2 und Bax. Verglichen wurden die Genexpressionen von limbalen epithelialen Zellen, ausgesät auf einer dezellularisierte humane oder porcine Kornea (humane / porcine Probe) mit der Genexpression von limbalen epithelialen Zellen ausgesät auf den Kunststoff einer herkömmliche Multi-Well-Platte (Kontrolle). Gemessen wurde an den Tagen (D) 3, 7 und 21. $p \leq ,05$

6.8 Mittelwertvergleiche des Proliferationsverhaltens

Um vergleichen zu können, ob es einen Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen der humanen und der porcinen Probe beziehungsweise zwischen den Proben und der Kontrolle gibt, wurden Mittelwertvergleiche basierend auf den Daten des Experiments „WST-1-Proliferationsassay“ (Kap. 2.2.2.5) gemacht und in Kapitel 3.5 näher erläutert. Zu erkennen ist, dass eine dezellularisierte humane Kornea eine vergleichbare Wirkung über 21 Tage auf das Proliferationsverhalten von LESC ausübt wie eine dezellularisierte porcine Kornea. Beide Proben unterscheiden sich nicht von der Kontrolle.

Tabelle 12: Proliferationsverhalten von limbalen Stammzellen im Vergleich

Zeitpunkt	Vergleich	Df	p
D3	Humane Probe / Porcine Probe	t(4) = ,01	,993
D7		t(4) = ,239	,822
D21		t(4) = -1,385	,238
D3	Humane Probe / Kontrolle	t(4) = -,227	,832
D7		t(4) = -,368	,732
D21		t(4) = -1,7	,164
D3	Porcine Probe / Kontrolle	t(4) = -,320	,765
D7		t(4) = -,045	,966
D21		t(4) = ,907	,416

Dargestellt sind die Mittelwertvergleiche der Lichtabsorptionswerte im Rahmen eines WST-1-Proliferationsassays. Verglichen wurde die Lichtabsorption von limbalen epithelialen Zellen, ausgesät auf einer dezellularisierte humane oder porcine Kornea (humane / porcine Probe) mit der Lichtabsorption von limbalen epithelialen Zellen ausgesät auf den Kunststoff einer herkömmliche Multi-Well-Platte (Kontrolle) sowie zwischen den beiden Proben untereinander. Gemessen wurde an den Tagen (D) 3, 7 und 21. $p \leq ,05$

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Schrader, Herrn Prof. Dr. Christian Suschek und Herrn Prof. Dr. Gerd Geerling für die Möglichkeit, dieses spannende Projekt durchzuführen und für die Unterstützung auf diesem Weg.

Frau Dr. Sonja Mertsch und Frau Prof. Kristina Spaniol danke ich für die Entwicklung dieses Projekts. Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sonja Mertsch, die dieses Projekt betreut und mich während dieser Arbeit begleitet hat. Sie stand jederzeit mit wertvollen Korrekturen und Ratschläge zur Verfügung und hat stets das Beste aus mir herausgeholt.

Ebenfalls danke ich Frau Dr. Joana Witt für ihre Anregungen und interessanten Gespräche sowie allen Kollegen aus dem Labor für ihre methodischen Hilfestellungen.

An dieser Stelle möchte ich meine Unifreundinnen Paula, Lena und Anna nennen, die mich durch diese Zeit mit Höhen und Tiefen begleitet und so oft bestärkt haben.

Zuletzt geht der größte Dank an meine Familie. Meine Eltern haben mich nicht nur stets unterstützt, sie waren immer meine größten Fans, die stärksten Mutmacher und die verlässliche Heimat. Ohne sie wäre nichts von alledem möglich gewesen. Und meine Geschwister haben ein Band um uns drei gebunden, unzerstörbar und sicher. Ohne euch wäre ich nicht die, die ich jetzt bin.