

**Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der
Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Jost Hillenkamp

**Hochaufgelöste Mikroskopie mittels strukturierter Beleuchtung
zur altersabhängigen Akkumulation autofluoreszierender Granula im
retinalen Pigmentepithel des Menschen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Wobbe

aus Wiesbaden

Würzburg, Dezember 2022

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Ach

Koreferent: Professor Dr. Kai Schuh

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der Disputation: 30. Juni 2023

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie und Anatomie des Auges	2
1.2	Aufbau der Netzhaut	2
	1.2.1 Retinales Pigmentepithel	6
	1.2.2 Aufgaben des RPE	8
	1.2.3 Histologischer Aufbau der RPE-Zellen	10
	1.2.4 Granula des RPE: Melanosomen, Melanolipofuszin, Lipofuszin	10
1.3	Bildgebungsverfahren	15
	1.3.1 Ultrastrukturelle Aufnahmetechniken: EM, SEM	15
	1.3.2 Fluoreszenzmikroskopie	15
	1.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)	16
	1.3.4 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM)	17
	1.3.5 Klinische Fundusautofluoreszenz (FAF)	18
1.4	Humanes Gewebe	20
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Ethikvotum	23
2.2	Gewebe und Probenvorbereitung	23
2.3	Bildgebung	24
2.4	Bildverarbeitung	25
2.5	Computergestützte Analyse der Aufnahmen	25
2.6	Erweiterte Analyse der RPE-Zellkörper	29
2.7	Statistische Analyse	29
3	Ergebnisse	31
4	Diskussion	46
5	Zusammenfassung	53
6	Literaturverzeichnis	54
I.	Abbildungsverzeichnis	
II.	Tabellenverzeichnis	
III.	Abkürzungsverzeichnis	
IV.	Danksagung	
V.	Lebenslauf	
VI.	Publikationen	

1 Einleitung

Die Technik der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (structured illumination microscopy, SIM) ist eine etablierte ultrastrukturelle Aufnahmemethode, die der hochauflösenden Visualisierung intrazellulärer Strukturen dient. In der Ophthalmologie findet diese Art der Bildgebung bisher wenig Anwendung.

SIM ermöglicht die histologische Darstellung retinaler Strukturen, wie der Zellen des humanen retinalen Pigmentepithels (RPE). In den Zellen des RPE reichern sich Granula an, die für die Autofluoreszenz-Bildgebung von Bedeutung sind. Anhand der Morphologie und autofluoreszierenden Merkmale lassen sich grundsätzlich drei Granulatypen im RPE unterscheiden: Melanosomen (M), Melanolipofuszin (ML)- und Lipofuszin (L)-Granula. Die Anwendung der SIM ermöglicht die präzise Darstellung und Differenzierung dieser autofluoreszierenden Strukturen, sowie die Bestimmung ihrer Anzahl und Lokalisation.

Ziel der Arbeit ist die Darstellung der im humanen RPE lokalisierten Granula mithilfe der SIM. Anhand der unterschiedlichen Autofluoreszenz (AF) der Granula können diese innerhalb des RPE-Zellkörpers klassifiziert, sowie deren Anzahl und Dichte analysiert werden. Diese Analyse wird in Altersgruppen und Retinalokalisationen differenziert. Zudem sind direkte Vergleiche zwischen der Histologie (SIM, ex vivo) und klinischen Aufnahmen (Fundusautofluoreszenz, in vivo) kaum existent. Durch Ermittlung der Gesamt-AF pro Zelle in Korrelation zu der intrazellulären Granuladichte und -verteilung soll eine neue Interpretationsebene ermöglicht werden.

Diese Arbeit soll helfen anhand der gewonnenen Daten die Stoffwechselmechanismen der Retina und deren Einfluss auf die Fundusautofluoreszenz (FAF) besser verstehen zu können. Sie soll insbesondere dazu beitragen bestehende und neue klinische FAF-Bildgebungsverfahren zu validieren, die Diagnostik pathologischer Prozesse der Retina zu optimieren und sowohl eine möglichst frühe Erkennung als auch präzise Prognostik zu ermöglichen.

Zudem sollen die Daten eine belastbare Basis darstellen, um die mit einem hohen Zeitaufwand verbundene manuelle Zellanalyse einer geschulten künstlichen Intelligenz zu überlassen. Damit könnte der Analyseprozess von Gewebeproben immens beschleunigt werden und in seiner Effizienz maximiert werden.

1.1 Physiologie und Anatomie des Auges

Im Zentrum der Sinneswahrnehmung steht das Auge. Als eines der fünf Sinnesorgane, dient es der Wahrnehmung von optischen Reizen. Dabei übernimmt die Netzhaut (Retina), die aus einem sensorischen Teil mit Sinnes- und Stützzellen und dem retinalen Pigmentepithel (RPE) mit der Bruch-Membran besteht [1], den funktionellen Anteil des Sehvorgangs. Lichtsignale werden von den dort lokalisierten Photorezeptorzellen aufgenommen. Sie führen innerhalb dieser Zellen, durch einen komplexen Ablauf physikalischer und biochemischer Mechanismen, zu einer Weiterleitung der Informationen in Form eines elektrischen Signals. Dieses wird über den Nervus opticus an das Gehirn geleitet, dem Ort, an dem sie verarbeitet und interpretiert werden.

Das Auge lässt sich anatomisch in einen vorderen und einen hinteren Abschnitt differenzieren. Der Pars anterior umfasst die sichtbaren Bereiche wie die Bindehaut (Konjunktiva), Hornhaut (Cornea), Lederhaut (Sklera), Iris und Ziliarkörper, sowie die Linse.

Zum posterioren Teil gehören der Glaskörper, die Netzhaut (Retina) und die Aderhaut (Choroidea). Daneben stellen die Konjunktiva, Lider (Palpebrae) und Tränenorgane die sogenannten Anhangsgebilde des Auges dar [2].

Cornea und Sklera bilden die äußere Hülle des Auges. Von der Sklera ausgehend, erstreckt sich im Bereich des hinteren Augenpols die Lamina cribrosa, die damit den Faseraustritt des Nervus opticus aus dem Auge ermöglicht [2]. Zur Ernährung der Retina, insbesondere der Photorezeptorzellen, schließt sich die Choroidea an. Außen bilden größere Gefäße die Lamina vasculosa, gefolgt von einem fenestrierten Kapillarnetz (Choriokapillaris), das durch die Bruchmembran von der Retina abgegrenzt wird. Neben der versorgenden Funktion dient sie auch der Wärmekatalysation der beim photochemischen Prozess freiwerdenden Energie [2]. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass alle Anteile des Auges histologisch hoch differenziert und optimal an ihre jeweiligen Funktionen angepasst sind.

1.2 Aufbau der Netzhaut

Die Netzhaut (Retina) ist entwicklungsgeschichtlich und funktionell ein vorgeschobener Gehirnteil und damit Teil des zentralen Nervensystems [1]. Sie ist in zehn spezialisierte und interagierende Schichten differenziert [1]. Neben komplexen neuronalen Verknüpfungen, enthalten diese etwa 127 Mio. Photorezeptoren, die Sinnesrezeptorzellen der

Retina, und bilden damit den funktionellen Anteil des Sehvorgangs [2]. Dort ankommende Lichtsignale durchdringen zunächst alle Retinaschichten, sowie die apikal lokalisierten Photorezeptorzellen und werden dann am RPE reflektiert.

Ausgehend von der basolateral gelegenen Choriokapillaris und der Bruch-Membran werden die folgenden Schichten histologisch differenziert:

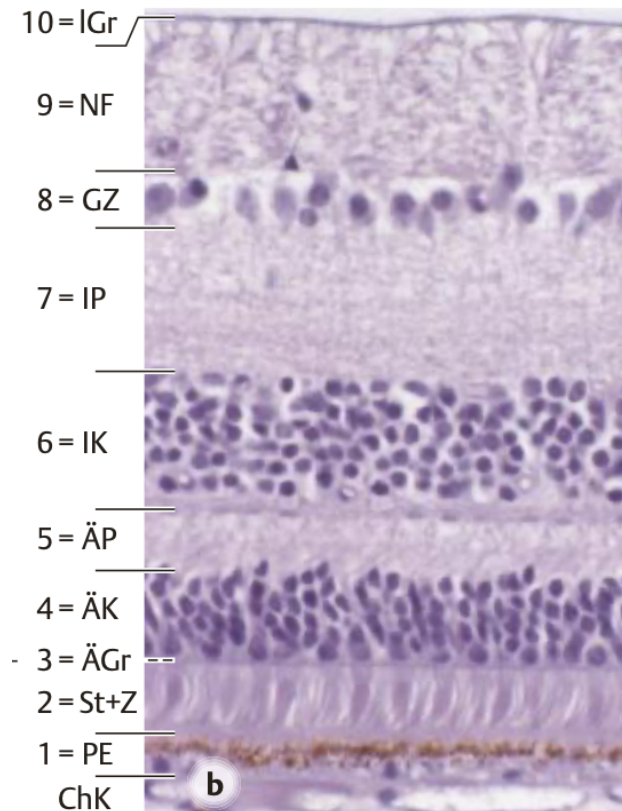


Abbildung 1: Histologische Darstellung der Retina

(1) Pigmentepithelschicht (*Stratum pigmentosum*), (2) Fortsätze der Photorezeptorzellen Zapfen und Stäbchen (Innen- und Außensegmente), (3) Äußere Grenzschicht (*Stratum limitans externum*), (4) Äußere Körnerschicht (*Stratum nucleare externum*): Perykarien der Photorezeptorzellen (1. Neuron), (5) Äußere plexiforme Schicht (*Stratum plexiforme externum*): Synapsen zwischen den axonalen Fortsätze des 1. Neurons und Dendriten des 2. Neurons, Synapsen mit Horizontalzellen), (6) Innere Körnerschicht (*Stratum nucleare internum*): Perykarien der bipolaren Zellen, Horizontalzellen, amakrinen Zellen und Müller-Zellen, (7) Innere Plexiforme Schicht (*Stratum plexiforme internum*): Synapsen mit Amakrinen Zellen und zwischen Axonen des 2. – und Dendriten des 3. Neurons), (8) Ganglienzellschicht (*Stratum ganglionicum*), (9) Nervenfaserschicht (*Stratum neurofibrarum*), (10) Innere Grenzschicht (*Stratum limitans internum*): Endfüße der Müller-Zellen und Basallamina

Nachdruck mit Genehmigung. © Georg Thieme Verlag KG, Abbildung aus Lüllmann-Rauch, Taschenlehrbuch Histologie [3]

Auf der Basallamina der Bruch-Membran sitzt die Pigmentepithelschicht fest auf. Das einschichtige Epithel pigmentierter Zellen hat einen wesentlichen Einfluss auf den Ablauf des Sehprozesses durch Vermittlung der Kommunikation zwischen Photorezeptoren, RPE und Choriokapillaris [1, 4].

Im Zentrum stehende Prozesse sind der Ionentransport aus dem subretinalen Kompartiment in den Blutkreislauf und ein damit korrespondierender, entgegengesetzter Transport von Nährstoffen wie Glucose, Retinol und Fettsäuren an die Photorezeptoren [5]. Zum konstanten Ablauf des Sehzyklus wird zudem 11-cis-Retinal benötigt, das im Sehprozess durch Absorption eines Photons, zu all-trans-Retinol umgesetzt wird [6-8]. Da dieses aufgrund des in den Photorezeptorzellen fehlenden Enzyms nicht reisomerisiert werden kann, herrscht ein reger Austausch zwischen Photorezeptorzellen und den Zellen des RPE, wo die Außensegmente der Photorezeptoren phagozytiert und die anfallenden Bestandteile intrazellulär prozessiert werden können [9-11].

Zudem übernimmt das RPE durch einen hohen Anteil absorbierender Pigmente, den hauptsächlich apikal gelegenen Melanosomen, die zentrale Schutzfunktion vor photooxidativen Prozessen in der Retina [12]. Diese führen auch zu einer verbesserten optischen Qualität durch die Reduktion von Streulicht auftreffender Lichtenergie [5, 13]. Der Prozess der Filterung und Absorption wird in seiner Effizienz maximiert, indem sich die Zellen des RPE in ihrer Morphologie lokalisationsabhängig unterscheiden und die darin vorhandenen Pigmente für Licht unterschiedlicher Wellenlängen spezialisiert sind [14, 15]. Im Zentrum dieses Prozesses stehen das Melanin in den Melanosomen, sowie die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin [16-18].

In der daran anschließenden Schicht sind die Fortsätze der Photorezeptorzellen (Innen- und Außensegmente) lokalisiert. Dabei werden zwei Typen von Photorezeptorzellen differenziert, Zapfen und Stäbchen. Sie gleichen sich in ihrem Grundaufbau aus einem lichtempfindlichen Fortsatz, einem Perykarion und einem axonalen Fortsatz [1]. Dabei sind das Innensegment (metabolischer Anteil) und das lichtempfindliche Außensegment über das Zilium miteinander verbunden. Form und Funktion des sensorischen Anteils unterscheiden sich bei den beiden Typen der Photorezeptoren [1, 8]. Zudem ist der Speicherort der Sehpigmente in den Außensegmenten zu differenzieren. Bei den Zapfen befinden sich diese in den Falten der Plasmamembran, wohingegen sie bei den Stäbchen in intrazelluläre Membranscheiben eingelagert sind. Durch Abschilfern der Membranen der Photorezeptor-Außensegmente, die anschließend über Phagozytose in das RPE aufgenommen werden, findet eine kontinuierliche Erneuerung statt [7].

Zapfen befinden sich hauptsächlich im Bereich der Makula lutea und weisen ihre größte Dichte (> 150.000 je mm^2) in einem Radius von etwa $500 \mu\text{m}$ auf, die mit zunehmender Exzentrizität abnimmt [19]. In der Fovea centralis kommen nur Zapfen vor [19]. Es ermöglichen drei Zapfentypen (Rot- Grün- und Blauzapfen) durch ihre Farbempfindlichkeit das trichromatische – (Farbsehen) und das photopische Sehen (Tagsehen) [2].

Stäbchen hingegen sind vorwiegend in der Peripherie lokalisiert und ermöglichen durch ihre hohe Lichtempfindlichkeit das Sehen bei Dämmerung und in der Nacht [1].

Die Photorezeptortypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Funktion und Lokalisation, sondern auch bezogen auf ihre Anzahl besteht ein Ungleichgewicht. So stehen ca. 7 Mio. Zapfen, ungefähr 120 Mio. Stäbchen gegenüber [1, 19].

Die Perikaryen der Photorezeptorzellen, in denen die Übersetzung der Lichtreize in elektrochemische Signale stattfindet, befinden sich in der äußeren Körnerschicht. Von dort werden die Signale an die Ganglienzellen, über bipolare Zellen, Horizontalzellen und Amakrinezellen, deren Axone zur Papille ziehen und den Sehnerv bilden, weitergeleitet [1].

Müller-Zellen, deren Zelleiber in der inneren Körnerschicht liegen, umgeben mit ihren Ausläufern die Photorezeptoren. Sie bilden als retinale Gliazellen eine Sonderform der Astroglia und durchspannen die gesamte Dicke der neuronalen Retina [20]. Bedeutsame Aufgaben sind das Bündeln des Lichts (ähnlich einer Faseroptik) [1], sowie die Versorgung der Zapfen mit Vitamin-A-Derivaten, die für den Prozess der Phototransduktion benötigt werden [21].

Die Macula lutea ist ein eng umschriebenes Areal der Retina (Durchmesser ca. 3 mm), in dem die meisten Zapfenzellen lokalisiert sind [1, 19].

Im Zentrum dieses Bereiches befindet sich temporal der optischen Achse der Ort des schärfsten Sehens (lat. Fovea centralis). Dabei handelt es sich um eine trichterförmige Einziehung, bei der die inneren Retinaschichten nach peripher verlagert sind. Die dort vorhandene besonders hohe Packungsdichte der Zapfen, die mit einer 1:1-Verschaltung von Ganglienzellen zu Zapfen einher geht, sorgt für ein besonders hohes Auflösungsvermögen [1].

Nasal dieser Region ist die Papilla nervi optici lokalisiert, die als Austrittspunkt der Nerven und Gefäße gilt. Damit ist dieser als einziger Ort der Retina frei von Photorezeptoren und imponiert in der Gesichtsfelduntersuchung als „blinder Fleck“ [1].

1.2.1 Retinales Pigmentepithel

Eingebettet zwischen den äußeren Segmenten der Photorezeptorzellen (apikal) und der Bruchmembran (basolateral) befindet sich das retinale Pigmentepithel (RPE). Das einschichtige kubische Epithel mit langen apikalen Mikrovilli spielt eine zentrale Rolle bei der Versorgung der Photorezeptorzellen mit notwendigen Nährstoffen und dem Abbau der dort, beim Sehprozess anfallenden Stoffwechselprodukte [5].

Apikal ziehen Mikrovilli in den subretinalen Raum und verlinken die Zellen des RPE mit den Außensegmenten der Photorezeptoren [22]. Lange Mikrovilli (5-7 μm) dienen der Vergrößerung der Oberfläche, um den epithelialen Transport zu maximieren. Zusätzlich umgeben kürzere Mikrovilli hüllartig die Photorezeptoren und lassen damit einen Ort der Phagozytose der Photorezeptor-Außensegmente entstehen [23].

Eine weitere wichtige Struktur zwischen der Photorezeptorschicht und dem RPE wird durch die Interphotorezeptormatrix (IPM) gebildet. Durch Auffaltung des Neuroepithels entsteht ein Freiraum zwischen dem späteren RPE und der Retina, der von der IPM ausgefüllt wird [24, 25]. Diese Struktur ist elementar für die weitere Entwicklung der Retina und Reifung des RPE. Es vermittelt die Adhäsion, den Austausch von Nährstoffen und stattfindende Phagozytoseprozesse. Zudem enthält es wichtige Wachstumsfaktoren, Retinol-bindendes Protein (engl. Interphotoreceptor retinoid-binding protein, IRBP), Hyaluron und hyaluronanbindende Proteoglycane, sowie sulfatierte Glucosaminoglycane und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) [5, 24].

Basal sitzt das RPE fest auf der Bruch Membran auf. Tight junctions zwischen den RPE-Zellen bilden als äußere Blut-Retina-Schranke eine Barriere zwischen dem subretinalen Raum und der Choriokapillaris [5, 26].

Die Photorezeptorzellen sind aus einem äußeren Segment mit Stapeln (sog. „Discs“) rhodopsinhaltiger Scheiben und einem inneren Segment, das diverse Stoffwechselmechanismen übernimmt, aufgebaut. Beide Segmente sind über einen Ziliarfortsatz miteinander verbunden. In den Disc-Stapeln der Photorezeptor-Außensegmente ist zu über 90 % des Proteingehalts das Sehpigment Rhodopsin vertreten [27]. Es besteht aus dem Transmembranprotein Opsin und dem lichtempfindlichen Chromophor 11-cis-Retinal, einem Derivat des Vitamin A [1, 27].

Der Sehzyklus beginnt mit einer lichtinduzierten Absorption von Photonen aus Rhodopsin. Diese Photoaktivierung resultiert in einem stereochemischen Umbau des 11-cis-Retinal zu seinem Isomer all-trans-Retinal. Die nachfolgend in Gang gesetzte biochemische Kaskade der Phototransduktion führt mit der Konformationsänderung von Rhodopsin zu

einer Stimulation von Transducin [6]. Die daraus folgende Übertragung der Signale an Neuronen zweiter Ordnung (neuronal Signaltransduktionskaskade) entsteht durch einen cGMP-gekoppelten Konzentrationsabfall, der in der Hyperpolarisation der Plasmamembran resultiert [27]

Im unbelichteten Zustand befindet sich die Zellmembran in einem depolarisierten Stadium. Dieses wird durch eine lichtinduzierte Umwandlung von 11-cis-Retinal zu all-trans Retinal mit der daraus folgenden Hyperpolarisation der Rezeptorzellmembran unterbrochen. Diese Vorgänge unterscheiden sich bei den verschiedenen Rezeptortypen nicht. Die unterschiedliche Ansprechbarkeit beruht auf unterschiedlichen Absorptionsmaxima der spezifischen Opsine, sodass Organismen Licht unterschiedlicher Wellenlängen wahrnehmen können [28].

Zur Regeneration des all-trans-Retinals sind die Photorezeptorzellen selbst nicht in der Lage, weshalb sie auf zwei anderen Wegen erfolgen muss [5]. Hauptsächlich wird das all-trans-Retinal zum RPE transportiert und dort über Zwischenstufen durch ein Enzym, die all-trans-Isomerase, zur aktiven Form des 11-cis-Retinal reisolmerisiert, um in den Photorezeptorzellen anschließend wieder zur Verfügung zu stehen [5, 29]. Anteilig scheint dieser Prozess über ein bisher undefiniertes Enzym mit Isomerhydrolasefunktion stattzufinden [27].

In den Photorezeptor-Außensegmenten reichern sich Toxine an, die aus einem lichtinduzierten Zerfall von Molekülen, Proteinen und Lipiden resultieren [30]. Die höchste Konzentration dieser Substanzen befindet sich an der Spitze der Photorezeptor-Außensegmente [5]. Um einen optimalen Ablauf der Phototransduktion gewährleisten zu können, werden diese Toxine durch komplex koordinierte Mechanismen, die nach einem circadianen Muster stattfinden, abgebaut [31, 32]. Der Prozess der Neubildung beginnt am Zilium durch gezieltes Abschilfern der akkumulierten Anteile. Retinal oder Docosaheptaensäure können über alternative Wege reaktiviert und anschließend wieder in den Sehzyklus eingebaut werden [33, 34]. Ein Photorezeptor-Außensegment durchläuft innerhalb von 9-12 Tagen eine komplette Erneuerung [8].

Mit der spezifischen Bindung des Photorezeptor-Außensegments am RPE beginnt der Prozess der Phagozytose. Eine dadurch ausgelöste second-messenger Kaskade katalysiert die Aufnahme des gebundenen Außensegments [5]. Dieser Prozess findet mehrfach statt, sodass die Bildung neuer Membranen entlang des äußeren Segments eine Verdrängung bewirkt. Die am Ende der Zelle abgeworfenen Toxin-Pakete werden

schließlich vom RPE phagozytiert [8]. Das Gleichgewicht dieser beiden Prozesse entscheidet über die Länge und damit über die Funktionalität der Photorezeptor-Außensegmente, wodurch die Komplexität dieses Mechanismus und der Interaktion des RPE mit den Photorezeptorzellen verdeutlicht wird [5].

Die hohe phagozytotische Aktivität der RPE-Zellen ist ein zentrales Merkmal und übersteigt um ein Vielfaches die anderer Zellen im Körper [35].

In den Zellen des RPE befinden sich diverse Granula, deren Charakteristika in den folgenden Kapiteln genauer beleuchtet werden.

1.2.2 Aufgaben des RPE

Mit einer Vielzahl von Mechanismen beteiligt sich das RPE an dem optimalen Ablauf des Sehvorgangs. Neben epithelalem Transport, Phagozytose und der Sekretion von Wachstumsfaktoren, übernimmt es zentrale Aufgaben zur Sicherstellung des Sehzyklus.

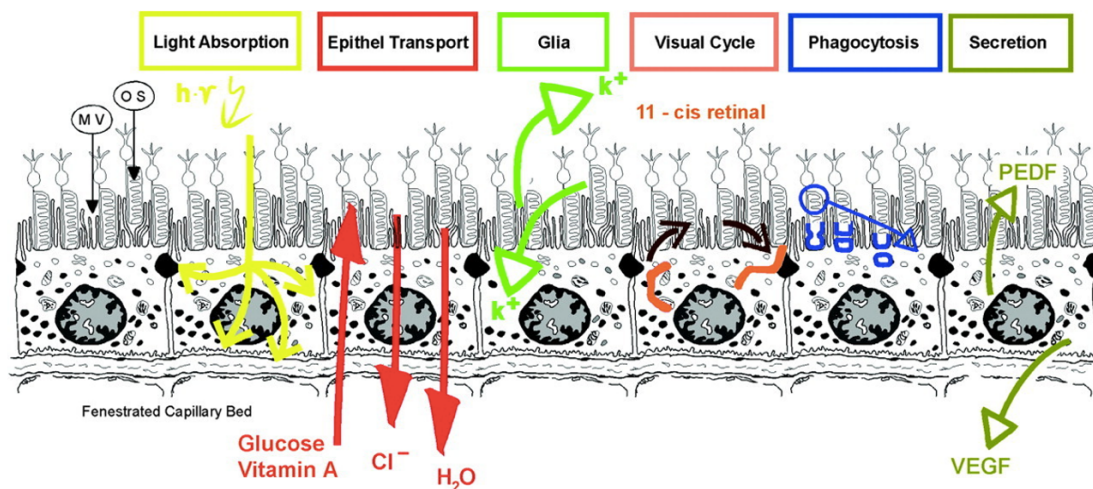


Abbildung 2: Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Schematische Übersicht der Funktionen des RPE (PEDF: pigment epithelium-derived growth factor, VEGF: vascular epithelium growth factor).

Nachdruck mit Genehmigung. © The American Physiological Society, aus: Strauß et al., 2005 [5]. Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc. vermittelt.

RPE-Zellen besitzen die Fähigkeit auftreffendes Licht zu filtern und zu absorbieren. Die Absorption wird durch eine komplexe Zusammensetzung verschiedener Pigmente, die ein Spektrum unterschiedlicher Wellenlängen abdecken, gewährleistet. Hauptakteur ist

das Melanin in den Melanosomen [36]. Unterstützt wird dieser Mechanismus insbesondere durch die in den Photorezeptoren eingelagerten Carotinoide Lutein und Zeaxanthin, die auf blaues Licht (488 nm) spezialisiert sind [17, 37]. Diese Pigmente decken damit ca. 60% der stattfindenden Lichtabsorption ab [5].

An der weiteren nicht-enzymatischen Reduktion photo-oxidativer Prozesse sind unter Anderem beta-Carotene, alpha-Tocopherol und Guthationen beteiligt [30]. Die Diversität der absorbierenden Anteile impliziert die Annahme, dass noch weitere Zellbestandteile an der Lichtabsorption beteiligt sein könnten. Dieser Prozess ist allerdings noch nicht abschließend geklärt.

Ein weiterer Protektionsweg gelingt den Zellen des RPE über enzymatische Abwehr mit Hilfe hoher Konzentrationen antioxidativer Substanzen wie der superoxiden Dismutase und Catalase [38]. Zudem werden Abwehrprozesse sowohl durch zelleigene Reparaturmechanismen der DNA, als auch von Proteinen und Lipiden katalysiert [5].

Neben den genannten Mechanismen sind regenerative Fähigkeiten der RPE-Zellen von zentraler Bedeutung. Es handelt sich primär um den Reisoimerisationsprozess des all-trans- zum 11-cis-Retinal und das Abschilfern und Phagozytieren der Membranen der Photorezeptor-Außensegmente. Damit wird deren Funktionsfähigkeit und folglich der Ablauf des Sehzyklus sichergestellt.

Darüber hinaus produziert und sezerniert das RPE eine Reihe von Wachstumsfaktoren, die für die strukturelle Integrität der Retina und der Choriokapillaris essenziell sind. Insbesondere die Faktoren PEDF (Pigment epithelium-derived factor) und VEGF (vascular endothelial growth factor) sind von Relevanz. PEDF gilt als neuroprotektiver Faktor, wohingegen VEGF präventiv auf die Zellapoptose wirkt und als wesentlicher Faktor für ein intaktes Epithel der Choriokapillaris gilt [5].

Die erhöhte photo-oxidative Aktivität der Retina entsteht durch eine physiologisch sauerstoffreiche Umgebung. Zusätzlich zu der überdurchschnittlich hohen Durchblutung der Choriokapillaris hat das venöse Blut in diesem Bereich noch einen Sauerstoffanteil von über 90% und bietet damit ideale Voraussetzungen für photo-oxidative Prozesse [5, 39]. Schlussfolgerung ist: entsteht ein Ungleichgewicht zwischen Reparaturmechanismen und toxischen Faktoren, steigt der oxidative Stress in den Zellen.

1.2.3 Histologischer Aufbau der RPE-Zellen

Das RPE ist ein kubisches Epithel neuroektodermalen Ursprungs, das zwischen der Bruch-Membran und den Außensegmenten der Photorezeptoren lokalisiert ist [5].

Im Horizontalschnitt weisen die Zellen des RPE eine polygonale Struktur auf [5]. Die dicht gepackten Zellen folgen einer wabenartigen Anordnung, die allerdings keinesfalls eine homogene Zellschicht bilden [40]. Ihr Aufbau ist polar. Am apikalen Pol befinden sich lange Mikrovilli und Microplacae, die die Photorezeptor-Außensegmente umschließen, basolateral zeigen sich Einfaltungen und die Zellen des RPE stehen hier über die Bruch-Membran mit dem fenestrierten Endothel der darunterliegenden Lamina choriocapillaris in Verbindung [5].

Die RPE-Zellen passen sich lokal den Stoffwechselbedürfnissen der Retina an. Diese sind besonders hoch im Bereich der Fovea, an der sich nur Zapfen-Photorezeptoren befinden [19]. Damit zeichnet sich dieser Ort durch eine hohe Zelldichte, insbesondere hexagonaler Zellen aus, die zudem kleiner sind als die der Perifovea oder der Peripherie. Darüber hinaus unterscheiden sie sich in der Anzahl ihrer Zellkerne [41]. So befinden sich im Bereich der Fovea fast ausschließlich mononukleäre RPE-Zellen, wohingegen in perifovealen Bereichen ca. 10% binukleäre Zellen vorkommen [42, 43]. Zellkerne weisen keine Autofluoreszenz auf und heben sich dadurch deutlich vom hellen Autofluoreszenzsignal des Lipofusins und Melanolipofusins ab [43].

Intrazellulär existieren Granula von unterschiedlicher Morphologie und Zusammensetzung. Mittels hochauflösender Mikroskopietechniken kann eine Anzahl von mehreren hundert Granula pro RPE-Zelle nachgewiesen werden [44-46]. Zeitlebens unterstehen diese in ihrer Anzahl, Zusammensetzung und Lokalisation dynamischen Prozessen [40, 47].

1.2.4 Granula des RPE: Melanosomen, Melanolipofuszin, Lipofuszin

Melanosomen in RPE-Zellen sind stark pigmentierte, elektronendichte, spindelförmig oder sphärisch erscheinende Granula, die insbesondere in den apikalen Bereichen und Mikrovilli der Zellen lokalisiert sind [12, 44, 46]. Sie dienen der Filterung und Absorption von Lichtenergie, die auf die Retina trifft [48]. Damit wird Streulicht reduziert und die optische Qualität verbessert [5]. Zudem sind die Granula essentieller Bestandteil des Schutzes vor photo-oxidativen Prozessen, wobei die optimale Absorption aus dem Zu-

sammenspiel verschiedener Pigmente, die auf unterschiedliche Wellenlängen spezialisiert sind, resultiert [5]. Melanosomen sind schon zu Beginn des Lebens im RPE nachweisbar. Erst in der zweiten Lebensdekade akkumulieren Lipofuszin und Melanolipofuszin signifikant [40, 49].

Lipofuszin-Granula haben einen Durchmesser von ca. 1 μm und besitzen ausgeprägte autofluoreszierende Eigenschaften [50]. Es handelt sich um ein heterogenes Material, das sich aus einer Mischung von Lipiden, Proteinen (weniger als 2%) [51] und verschiedenen fluoreszierenden Verbindungen zusammensetzt, deren am besten beschriebenes Fluorophor das Pyridinium-Bis-Retinoid N-Retinylden-N-Retinylethanolamin (A2E), ein Derivat von Vitamin A, ist [52]. Es gilt als Abfallprodukt von Stoffwechselprozessen, das sich im Laufe des Lebens nicht nur im RPE, sondern auch in weiteren aktiven postmitotischen Zellen des Körpers, wie Herzmuskelzellen und ausgewählten Neuronen ablagert [53]. Das Lipofuszin des RPE entsteht als Nebenprodukt des Sehzyklus. Die Granula sind zunächst mit zunehmendem Alter progredient vorhanden und werden dabei als akkumulierte Produkte nicht wiederverwendbarer Bestandteile der Außensegmente von Stäbchenrezeptoren verstanden [52]. Im hohen Alter reorganisieren sich diese Granula und werden teilweise aus den Zellen geschleust, sodass die AF entsprechend sinkt - histologisch und klinisch nachweisbar [54, 55].

Neben diesen beiden Granulatypen wird Melanolipofuszin als komplexes Granulum gesondert betrachtet. Diese Granula weisen Varianten ihres Erscheinungsbildes auf. Meist stellt sich ein stark pigmentiertes Zentrum (Melaninhäufung) mit autofluoreszierendem Rand aus Lipofuszinanteilen dar [49].

Die Autofluoreszenz (AF)-Eigenschaften der RPE-Granula basieren auf der Anwesenheit von Molekülen mit spezifischen Anregungs- und Emissionseigenschaften. Diese sogenannten Fluorophore können Lichtenergie aufnehmen, wodurch sie in den Zustand eines höheren Energieniveaus gelangen. Bei einem veränderten energetischen Zustand fällt das angeregte Molekül auf den Ausgangszustand zurück. Die dabei in Form von Photonen freiwerdende Energie bewirkt eine Emission von Licht einer längeren Wellenlänge [56, 57].

Die Fundusautofluoreszenz (FAF) entsteht durch die in den RPE-Zellen angereicherten L- und ML-Granula, sowie Photooxidations- und Photodegradationsprodukte [56, 58].

In Abhängigkeit der Anregungswellenlänge unterscheiden sich die Granula hinsichtlich ihrer AF-Eigenschaften. L-Granula sind bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm

stark autofluoreszent und damit für den Großteil der Gesamt-AF des Fundus verantwortlich [56, 59]. Melanosomen reagieren bei dieser Wellenlänge lichtabsorbierend, während bei einer Anregung mit Nahinfrarotlicht (787 nm) leichte AF-Eigenschaften gezeigt werden konnten [60]. Sofern im Folgenden nicht anders angegeben, beziehen sich die Angaben der AF auf eine Anregungswellenlänge von 488 nm.

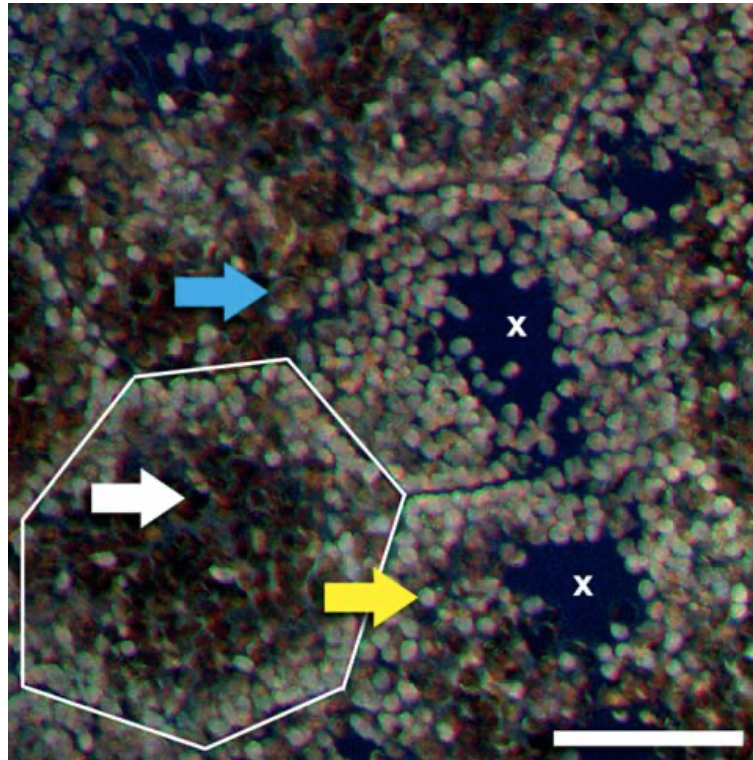


Abbildung 3: Autofluoreszierende Granula in RPE-Zellen

RPE-Zellen weisen eine polygonale Geometrie auf (siehe beispielhafte Umrandung einer RPE) und akkumulieren in ihren Zellkörpern verschiedene Granulatypen: Lipofuszin (gelber Pfeil), Melanolipofuszin (blauer Pfeil) und Melanosomen (weißer Pfeil). Die Zellkerne weisen keine Autofluoreszenz auf (x: granulafreie Areale, Zellkern).

Aufnahme mittels strukturierter Beleuchtung, Anregung 488 nm; Spender: 82 Jahre, keine retinalen Veränderungen; Maßstab: 10 μm .

Nachdruck mit Genehmigung. © Georg Thieme Verlag KG, Abbildung aus: Ach et al. 2019 [47].

Das Vorkommen der Granula variiert sowohl bezüglich ihrer Lokalisation auf der retinalen Landkarte, als auch innerhalb der Zellen des RPE [61]. Diese regionalen Unterschiede passen sich zeitlebens an [40]. Damit einhergehend steigt auch das durch die Granula eingenommene Zellvolumen. Zudem ist eine stetig, beinahe linear zunehmende Gesamt-AF der Zellen erkennbar [40].

In den fovealen RPE-Zellen verzeichnet sich ein vergleichsweise hoher Anteil an Melanosomen, wobei hier kaum L-Granula zu finden sind. In Arealen der Perifovea und der nahen Peripherie sind überwiegend Melanolipofuszin und Lipofuszin angesiedelt.

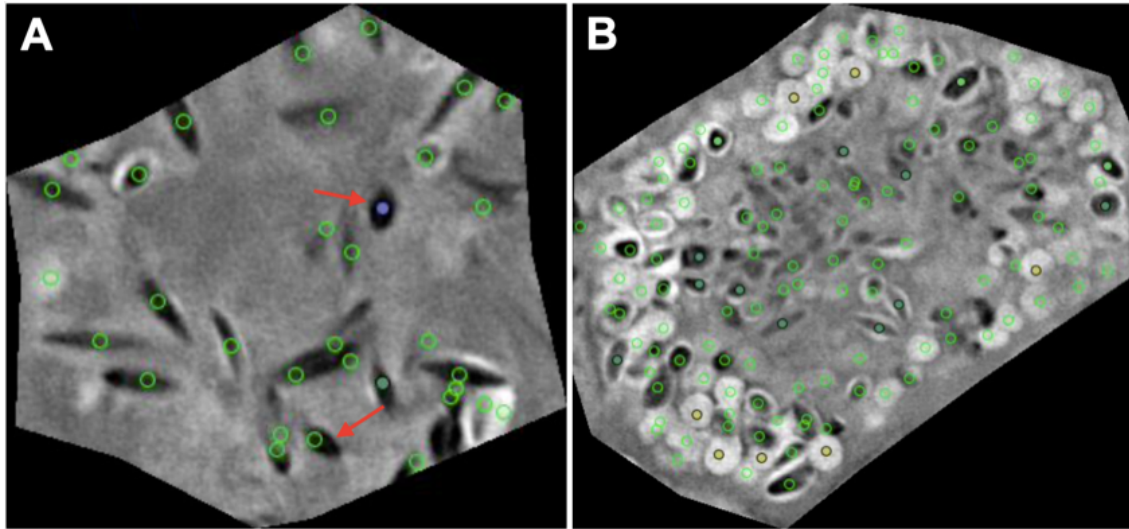


Abbildung 4: Ausschnitte einer fovealen- und perifovealen RPE-Zelle

Dargestellt sind beispielhafte Schnittbilder (SIM) einer fovealen- und perifovealen RPE-Zelle zur Verdeutlichung der regional charakteristischen Granulaverteilung. Die grünen Kreise stellen die in anderen Ebenen markierten Granula dar. Spenderin: 47 Jahre alt.

(A) Fovealer RPE-Zellschnitt, rote Pfeile markieren identifizierte Melanosomen. **(B)** Perifovealer RPE-Zellschnitt, deutlich erkennbar das hohe Aufkommen von ML- und L-Granula.

Betrachtet man die Granula-Verteilung innerhalb der RPE-Zellen, erkennt man, dass sich Melanosomen in den apikalen Bereichen befinden, gefolgt von einer Übergangszone variabler ML-Granula. Das basale Kompartiment enthält vermehrt L-Granula. Je nach Alter, beginnen diese Granula schon weiter apikal in Erscheinung zu treten. Die insgesamt steigende Anzahl der L-Granula kann als Indikator für altersbedingte Veränderungen bezeichnet werden. Mit diesem Vorgang wird ein erhöhter oxidativer Stress in den RPE Zellen in Verbindung gebracht, bei dem Lipofuszin als photoinduzierbarer Generator von Superoxidanionen, reaktiven Sauerstoffspezies und Wasserstoffperoxid gilt [62].

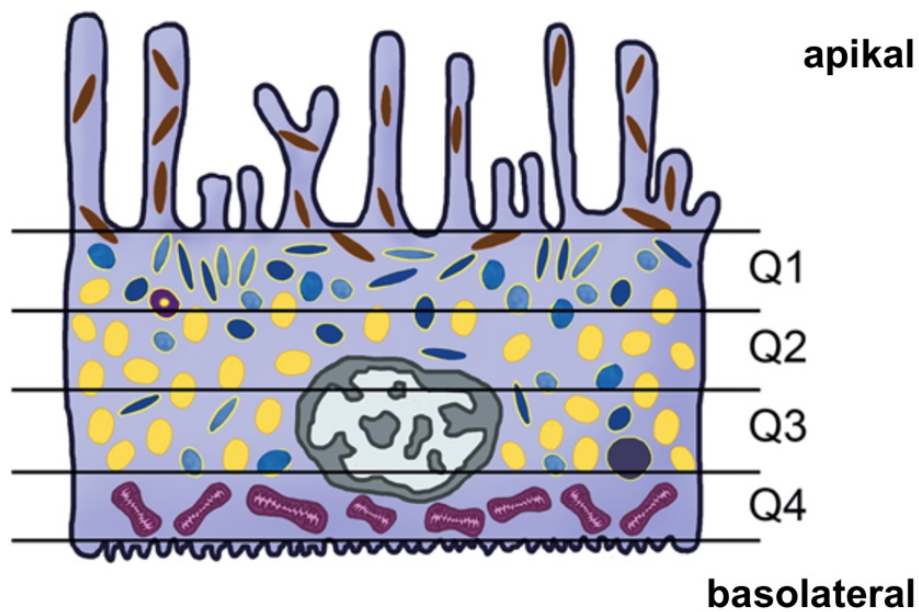


Abbildung 5: Intrazelluläre Verteilung der Granula einer RPE-Zelle

Diese schematische Abbildung einer RPE-Zelle zeigt die intrazelluläre Verteilung der Granula. Lipofuszin: gelb, Melanolinopofuszin: blau, Melanosomen: braun, Nukleus: grau, Mitochondrien: violett. Q1-4: Einteilung in Quartile von apikal nach basolateral.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Diese Veränderungen können einen negativen Einfluss auf die Entstehung krankheitsbedingter Prozesse der Retina haben. Ein prominentes Beispiel ist die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Dabei handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, die durch degenerative Veränderungen des RPE zu einem Untergang der Photorezeptoren und damit zu einer irreversiblen Erblindung führt [63]. Dieser Prozess stellt in der älteren Bevölkerung der Industrieländer die häufigste Erblindungsursache dar [64]. Die histopathologischen Veränderungen entstehen in diesem Zusammenhang auf der Grundlage einer Verringerung der lokalen antioxidativen Enzyme im RPE, sowie einer Abnahme der Dichte des Makulapigments, die in Kombination mit dem altersbedingten Anstieg des oxidativen Stresses zu degenerativen zellulären Ereignissen führen [61].

1.3 Bildgebungsverfahren

1.3.1 Ultrastrukturelle Aufnahmetechniken: EM, SEM

Zur Darstellung kleinster Strukturen im unteren Mikrometer- bis Nanometerbereich wird die Rasterelektronenmikroskopie (Scanning electron microscopy, SEM) eingesetzt. Das Prinzip dieser Technik ist ein rasterförmiges Abtasten des zu untersuchenden Objekts durch einen feinen Elektronenstrahl. Die Signalmodulation entsteht durch Wechselwirkungen zwischen Elektronen und Objekt, sodass die Bildgebung auf der Detektion emittierter Sekundärelektronen basiert [65].

Es werden unterschiedliche Varianten der Elektronenmikroskopie zur Anwendung gebracht. Ein besonderer Vorteil der SEM ist die Aufnahmemöglichkeit solider Objekte, sodass eine aufwändige Präparation der Proben entfällt. Die SEM-Technik wurde daher schon 1978 von Feeney zur Darstellung von RPE-Zellen eingesetzt [41], wobei sie diese mit Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie ergänzte.

Eine relativ neue Variante der SEM stellt die Technik der Serienschicht-Rasterelektronenmikroskopie (Serial block-face scanning electron microscopy, SBFSEM) dar, wie sie von Pollreisz et al. verwendet wurde [44]. Mit dieser ultrastrukturellen Aufnahmetechnik gelingt es Gewebestrukturen mit einer hohen Auflösung darzustellen [66]. Durch die Kombination des sog. Block-Face-Imaging mit seriellen Schnitten, die in der Kammer eines Rasterelektronenmikroskops gewonnen werden, können auch feinste zelluläre Prozesse identifiziert und die entstandenen Schnittbilder kombiniert dargestellt werden [66].

Zur Anfertigung dieser Aufnahmen werden die Proben zunächst in Epoxidharz fixiert. Anschließend werden im Rasterelektronenmikroskop robotisch mehrere hundert Schnitte (300-700 Schichten) mit einer Dicke von 125 nm pro Ebene angefertigt [44]. Von jedem Schnitt wird eine EM-Aufnahme angefertigt. Dabei werden die Sekundärelektronen jedes Scans der aufeinanderfolgenden Schichten zu einem dreidimensionalen Datensatz verrechnet.

1.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Lichtmikroskopische Aufnahmen hoher Kontrastierung können mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie angefertigt werden. Codiert man dabei die zu untersuchenden Objekte mit fluoreszierenden Farbstoffen oder macht sich deren Autofluoreszenz zunutze, so können spezifische, quantifizierbare Informationen über subzelluläre Prozesse gewonnen

werden [57]. Die Probe wird mit Licht einer bekannten Anregungswellenlänge beleuchtet. Dazu wird ein Anregungsfilter in den Lichtweg zwischen Lichtquelle und Probe eingesetzt. Durch zwischengeschaltete Elemente, wie einen dichroitischen Teilerspiegel und Emissionsfilter, gelingt es das von der Probe emittierte Licht gesondert zu detektieren [67]. Das Anregungslicht wird auf die Probe reflektiert, wobei das emittierte Licht den Filter passiert, und zum Detektor geleitet wird. Externes Anregungslicht oder Hintergrundfluoreszenz werden durch zusätzliche Emissionsfilter blockiert.

1.3.3 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) erlaubt hochauflösende Darstellungen auf Zellebene, die in der Lage ist, die Grenze der lateralen Auflösung zu überschreiten [68]. Diese ist aufgrund der endlichen Wellenlänge des Lichts grundlegend begrenzt [69].

Der Strahlengang entsteht durch Fokussierung eines Laserstrahls, der durch einen dichroitischen Spiegel abgelenkt und durch eine Objektivlinse auf die fluoreszierende Probe fokussiert wird. Dort emittierte Fluoreszenzstrahlung wird über das Objektiv gesammelt, durchläuft den dichroitischen Spiegel und wird durch eine konfokale Blende und einen Emissionsfilter zum Detektor geleitet [70]. Durch die Blende kann nur das Licht erfasst werden, das den kleinen Durchmesser passiert. So werden Streulicht und defokussierte Bilder physikalisch ausgeblendet und der Kontrast erhöht. Der Emissionsfilter selektiert zudem den zu untersuchenden Wellenlängenbereich des von der Probe emittierten Lichts. Im Wesentlichen erfolgt die zweidimensionale Erfassung von Objektinformationen in drei Verarbeitungsschritten. Zunächst wird die Probe zeilenweise mit dem fokussierten Laserstrahl abgerastert. Anschließend wird die von der Probe emittierte Fluoreszenzstrahlung pixelweise detektiert, sodass im letzten Schritt die Digitalisierung der vorliegenden Objektinformation erfolgen kann. In Verbindung mit Photomultipliern können damit Fluoreszenzemissionen im Bereich von 400 bis 750 nm untersucht werden [71].

Die konfokale LSM unterscheidet sich durch punktweise Bestrahlung der Probe von dem konventionellen Lichtmikroskop, bei dem alle Bildpunkte gleichzeitig detektiert werden und zudem durch die dem Detektor vorgeschaltete konfokalen Blende, die in einer zur Objektebene konjugierten Zwischenbildebene lokalisiert ist. Mithilfe der konfokalen LSM können Bilder aus verschiedenen Präparatebenen aufgenommen werden, sodass ein

dreidimensionaler Datensatz entsteht, der Erkenntnisse über die räumliche Struktur der Probe gewinnen lässt.

1.3.4 Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie (SIM)

Durch den Einsatz der strukturierten Beleuchtung (engl. structured illumination microscopy, SIM) ist es gelungen die Grenze der lateralen Auflösung in einem nicht-konfokalen Weitwinkel-Fluoreszenzmikroskop zu überschreiten [72]. In direktem Vergleich zu der konventionellen Weitwinkelmikroskopie resultiert daraus eine doppelt so hohe laterale Auflösung von bis zu 110 nm [50, 72].

Bei der SIM-Aufnahmetechnik wird von der Mikroskopoptik ausgehendes Licht durch ein Beugungsgitter zu einem Beleuchtungsmuster moduliert, sodass die notwendige räumliche Struktur entsteht. Diese räumlich modulierte strukturierte Beleuchtung wird anschließend über einen dichroitischen Spiegel auf die Probe projiziert. Die von der Probe ausgehenden, feinen Emissionsmuster lassen durch eine multiplikative Überlagerung (des bekannten Beleuchtungsmusters und der unbekanntenen Probenfrequenzen) Moiré-Streifen entstehen. Auf diesem Prinzip basiert die Auflösungssteigerung. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird direkt nach Durchlaufen eines Emissionsfilters auf der CCD-Kamera (CCD = engl. „charge-coupled device“ = lichtempfindliche elektronische Sensorelemente, die auf einem inneren Photoeffekt beruhen) erfasst. Die von einem Punkt emittierte Lichtmenge ist proportional zum Produkt aus (Auto-)Fluoreszenzdichte und lokaler Anregungslichtintensität. Durch die Anwendung einer bekannten, strukturierten Anregungslichtintensität auf eine Probenstruktur unbekannter (Auto-)Fluoreszenz, lassen sich durch Anfertigen einer Serie solcher Bilder mit anschließender Verarbeitung des entstandenen Interferenzmusters, hochauflösende Informationen über die Probe gewinnen, die normalerweise unauflösbar wären [73]. Sie übersteigen die Auflösungsgrenze um etwa den Faktor zwei [72].

Durch diese Möglichkeit der Visualisierung intrazellulärer Strukturen wird die optimierte Darstellung einzelner Granula der RPE-Zellen, sowie eine präzise Differenzierung der Granulatypen ermöglicht. Auf Basis der gewonnenen Informationen lassen sich Zellen mit ihrer intrazellulären Granulaverteilung zudem dreidimensional darstellen.

1.3.5 Klinische Fundusautofluoreszenz (FAF)

Die Fundusautofluoreszenz (FAF) der Retina ermöglicht mit entsprechenden bildgebenden Verfahren autofluoreszierende Bereiche des Augenhintergrundes in-vivo sichtbar zu machen [74]. Durch Bestrahlung der Retina mit sichtbarem Licht (Emissionsspektrum 480 – 800 nm, max. 600 nm bis 640 nm) [75] wurde mithilfe von FAF-Bildgebungssystemen eine Methode geschaffen, das RPE präziser darzustellen. Damit wurde die Erkennung metabolisch bedingter Veränderungen amplifiziert [74].

Um die Anregungs- und Emissionsspektren der Autofluoreszenzen kleiner Netzhautareale messen zu können wurde von Delori ein Spektrophotometer für non-invasive FAF-Messungen vorgestellt [76]. Dabei verwendet das Gerät unterschiedliche Anregungswellenlängen zwischen 430 und 550 nm. Ein Jahr später erfolgte die Durchführung der ersten in-vivo-Messung [58]. Dabei wurde durch Strahlentrennung in der Pupille und den Einbau von Bildverstärkern die FAF auf die absolute AF reduziert. Es zeigte sich ein breites Fluoreszenzsignal des Fundus von 500 bis 800 nm, mit einem Maximum zwischen 630 und 640 nm und optimaler Erregung bei 510 nm [58].

Eine alternative Form der in-vivo Bildgebung ermöglicht die Technologie der konfokalen Laser-Scanning-Ophthalmoskopie (cSLO). Diese wurde erstmals von Webb et al. beschrieben [77-79].

Dabei wird ein schmaler Laserstrahl nach Durchlaufen einer feinen Lochblende auf der Retina gebündelt, sodass diese rasterförmig abgetastet werden kann. An der Netzhaut werden die Strahlen reflektiert. Durch optische Elemente wird der Fokus des Punktes im Auge auf eine Zwischenebene gebündelt, sodass sich dieser nach dem Prinzip der konfokalen Aufnahmetechnik, simultan auf der Zwischenebene und der Retina befindet. Aus den detektierten Fokus-Punkten wird in einem Photomultiplier ein digitales Bild mit hohem Kontrast und hoher Tiefenaufösung erzeugt [80]. Defokussierte Bilder werden aufgrund der Konfokaltechnik physikalisch ausgeblendet.

Von Rückmann kombinierte diese Technik einige Jahre später mit der FAF-Messung [81]. Dabei wird, zur Erzeugung von Autofluoreszenzstrahlung, ein fokussierter Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm rasterförmig über den Fundus geführt, wodurch zweidimensionale Aufnahmen im Mikrometer-Bereich entstehen [81]. Um die Autofluoreszenz auf die des RPE zu filtern, wird außerhalb der Brennebene entstehendes Licht durch Gebrauch eines Barrierefilters für Wellenlängen < 521 nm unterdrückt.

Die Ergebnisse der Forschung auf diesem Gebiet wurden über die Jahre kontrastreicher. Ein Großteil der FAF geht danach von Lipofuszin aus [74]. Ergänzend konnte eine Korrelation spektraler Analysen mit dem Alter, sowie der topografischen Verteilung des Lipofuszin festgestellt werden, jedoch ohne ein präzises Interpretationsschema zu haben [58]. Eine altersbedingte Akkumulation von L-Granula, die sich in den Lysosomen des RPE ansammeln, bringt daher eine physiologisch steigende FAF mit sich [58, 82].

Davon zu differenzieren sind hypo- und hyperfluoreszierende Areale, die zu veränderten FAF-Mustern führen und oftmals in Zusammenhang mit degenerativen Netzhauterkrankungen, wie der AMD, stehen [47]. Bei der Geografischen Atrophie, als trockenes Endstadium der AMD, die aufgrund untergehender RPE-Zellen entstanden sind, konnte eine reduzierte FAF-Intensität nachgewiesen werden [55].

Die FAF bei 488 nm und 787 nm stellt sich im Gesunden wie folgt dar:

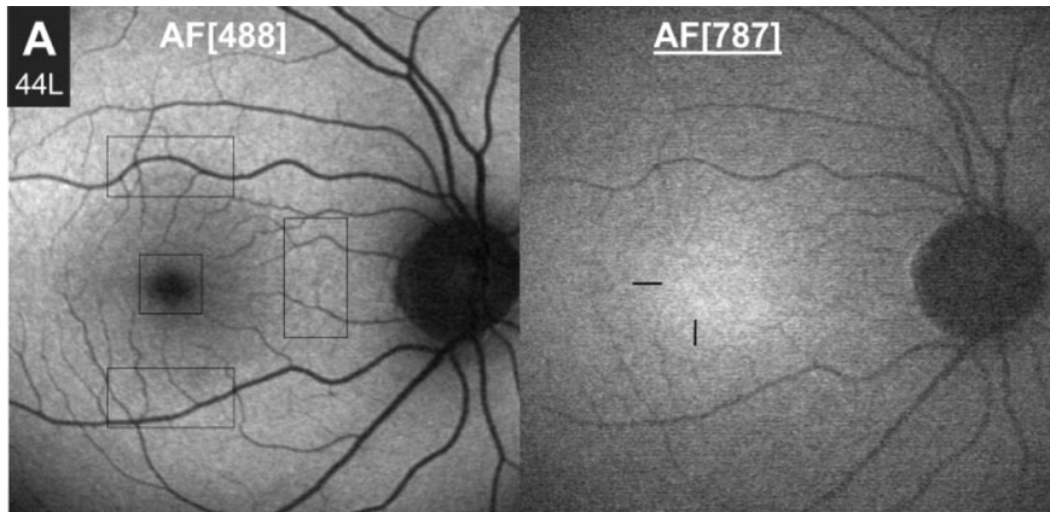


Abbildung 6: Fundusautofluoreszenz bei 488 nm und 787 nm

Fundusautofluoreszenz-Bildgebung mittels cSLO **(A)** zeigt die Fundusautofluoreszenz bei kurzer Exzitationswellenlänge von 488 nm **(B)** zeigt die Nahinfrarotautofluoreszenz bei 787 nm

Nachdruck mit Genehmigung. © Association for Research in Vision and Ophthalmology, aus: Keilhauer and Delori, 2006 [60]. Die Erlaubnis wurde durch das Copyright Clearance Center, Inc. vermittelt.

Bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm ist im Bereich der Fovea eine verminderte FAF zu finden. Diese zeigt sich aufgrund der Anwesenheit des Makulapigments und Melanin. Perifoveal nimmt die FAF zu. An der Papille ist aufgrund des dort fehlenden RPEs keine FAF vorhanden. Blutgefäße stellen sich durch Absorption des Anregungssignals dunkel dar.

Foveal ist bei einer Anregungswellenlänge von 787 nm die stärkste FAF festzustellen. Sie ist auf die höhere Melaninpigmentierung in diesem Bereich zurückzuführen. Gefäße und die Papille werden hypoautofluoreszent abgebildet. Bei dieser Anregungswellenlänge ist der Bildkontrast sichtbar geringer als bei der Anregungswellenlänge von 488 nm [60].

Zu den weiteren spektralen Diagnostiktools gehört die optische Kohärenztomografie (OCT). Die Technik basiert auf einem monochromatischen Laserstrahl, der unter einer Phasenverschiebung zwischen dem reflektierten Messstrahl und dem Referenzstrahl ausgewertet wird. Dazu wird niedrig-kohärentes Licht im Nah-Infrarot-Bereich verwendet [83]. Sie erstellt eine Querschnittaufnahme der Retina und der Sehnervpapille hoher Auflösung. Daher ist diese Aufnahmetechnik als klinische non-invasive Basisdiagnostik intraretinaler Veränderungen und Abhebungen des RPE besonders gut einsetzbar.

Die Reproduzierbarkeit der Aufnahmen steigt mit Optimierung der Scanning-Laser-Geräte zur Methodik der quantitativen Autofluoreszenz (qAF). Durch simultanes Einbringen des Strahlengangs und der Fluoreszenzprobe einer definierten AF, gelingt es auch die FAF unterschiedlicher Probanden miteinander vergleichbar zu machen [59].

Die Scanning-Laser-Geräte und deren Weiterentwicklungen zur Darstellung der klinischen AF haben sich als effiziente, non-invasive und gut reproduzierbare Instrumente der Bildgebung etabliert. Sie liefern Informationen, die über konventionelle bildgebende Verfahren hinausgehen.

1.4 Humanes Gewebe

Zu einer exakten Darstellung des humanen RPE-Gewebes ist ein systematisches, standardisiertes Vorgehen von enormer Wichtigkeit. Es bildet die Grundlage einer wissenschaftlich exakten Arbeitsweise und ermöglicht damit eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der analysierten Proben. Ein Verständnis für die Anatomie der gesamten neurosensorischen Netzhaut, des RPE sowie der angrenzenden Strukturen ist dabei entscheidend, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen geografischen Netzhautbereichen entwickeln zu können [84].

Schon 1941 definierte Polyak eine Terminologie der retinalen Topografie. Dabei beschrieb er den Aufbau der humanen Retinaregionen als konzentrisch [85]. Seine noch heute anerkannte Einteilung basiert auf Analysen der Neurobiologie der Retina des Menschen und der von Makaken. Anhand der Topographie der retinalen Ganglienzellen und

des lokalen Zapfen-Stäbchen-Verhältnisses werden in sechs Regionen (Foveola, Fovea, Parafovea, Perifovea, nahe- und ferne Peripherie) unterschieden [85].

Die heutige erweiterte Bildgebungstechnik ist aufgrund der Kombination einer höheren Bildqualität mit zusätzlichen Aufnahmeparametern, wie der Detektion der AF, in der Lage retinale Strukturen präziser voneinander zu differenzieren. Ein weiterer wesentlicher Faktor ist die Anwendung mehrstufiger Bildgebungs- und Präparationsprozesse, die eine exakte Bestimmung der fovealen Position ermöglichen. Damit geht eine standardisierte und vor allem systematische Aufnahmetechnik einher.

Diese Möglichkeit der Standardisierung der Aufnahmemuster war früheren Arbeiten durch Anwendung der Fluoreszenzmikroskopie [41] so nicht möglich.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Vor dem Hintergrund des aktuellen wissenschaftlichen Kenntnisstandes sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Wie stellen sich die Granula des humanen RPEs mittels modernster, hochauflösender Mikroskopie, der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (structured illumination microscopy, SIM) dar?
- Lassen sich durch diese Aufnahmemethode Zellbestandteile, insbesondere Granula mit morphologischen- und AF-Eigenschaften beschreiben, die durch die bisher angewendeten Bildgebungsmethoden nicht dargestellt werden konnten?
- Inwieweit lassen sich anhand der Analyse der RPE-Zellen altersspezifische Charakteristika und Entwicklungen feststellen?

Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollen:

- eine subzelluläre Grundlage für das Verständnis der RPE-Reifung, der Alterung und diagnostischer Bildgebungsmerkmale bilden.
- zur Diagnostik pathologischer Prozesse der Retina genutzt werden, insbesondere der AMD, um diese sowohl möglichst früh als auch prognostisch präziser zu ermöglichen.
- Basisdaten zur Schulung zukünftiger algorithmenbasierter klinischer Retinaanalysen zur Früherkennung von Pathologien darstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Ethikvotum

Alle Verfahren entsprachen den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Gegen die Studie und die Verwendung von menschlichem Gewebe wurden von den Ethikkommissionen der Universität von Alabama in Birmingham (USA) und der Universität Würzburg (AZ-208/15) keine Bedenken geäußert.

2.2 Gewebe und Probenvorbereitung

Es wurde Gewebe von 15 kaukasischen Spendern verwendet [43]. Diese wurden in zwei Alterskohorten eingeteilt (8 Spender \leq 51 Jahre, mit einer Spanne von 16 bis 51 Jahren und 7 Spender \geq 80 Jahre, zwischen 82 und 90 Jahren). Die Präparate der Retina umfassten den Bereich des RPE bis zur Bruch-Membran (RPE flatmount). Die Gewebequalität der Spenderaugen wurde durch eine zeitnahe Entnahme mit unmittelbar anschließender Präparation der Bulbi sichergestellt. Diese erfolgte durch das Advancing Sight Network (ehemals Alabama Eye Bank; Birmingham, Alabama, USA) innerhalb von 4,2 Stunden post mortem. Nach Präparation wurde das Gewebe durch Einlage in Paraformaldehyd (4%) und phosphatgepufferte Salzlösung c(PBS) = 0,1 mol/L konserviert.

Zum Ausschluss von Makula- und Netzhauterkrankungen des Spendergewebes wurden diese vorab mit einem Dissektionsmikroskop mittels Trans- und Epibeleuchtung untersucht [86].

Ein wesentlicher Punkt ist die möglichst exakte Bestimmung der fovealen Position und das Erhalten der Foveola. Dafür wurden in mehrstufigen Bildgebungs- und Präparationsprozessen sowohl die Anteile der Neuroretina als auch die Choriokapillaris entfernt [43].

Das Vorgehen bestand dabei zunächst aus der Präparation eines zentralen ca. 20 mm breiten Anteils der Probe, der den Sehnervenkopf und die Makula beinhaltet. Anschließend wurde die Retina mit einer Pinzette vom RPE abgelöst, um eine Lichtabsorption durch die neurosensorische Netzhaut während der AF-Bildgebung auszuschließen. Im darauffolgenden Schritt wurden Gefäße der Aderhaut zunächst grob entfernt, dann in aufwändiger Feinpräparation vollständig entfernt. Es resultierte eine alleinige RPE-Zellschicht von ca. 20 μ m Dicke.

Abschließend wurden jeweils drei vordefinierte Regionen nach der Einteilung von Polyak [85] und Quinn et al. [84] dargestellt: Fovea, Perifovea (4 mm oberhalb der Fovea) und nahe der Peripherie oberhalb der Fovea (mittlerer Abstand von der Fovea: $7,45 \pm 1,0$ mm).

2.3 Bildgebung

Die Bildgebung der RPE-Zellen erfolgte mittels hochauflösender Mikroskopie mit strukturierter Beleuchtung (SIM). Es wurde das SIM-Gerät ELYRA-S.1 der Firma Carl Zeiss Meditec (Jena, Deutschland) mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem Emissionslicht zwischen 510 und 750 nm eingesetzt.

Dabei wurden die RPE-Zellen mit einem Beleuchtungsraaster der SIM überlagert (Gitterraaster Abstand 28 μm ; Belichtungszeiten von 100–150 ms). Aufgenommen wurden die Bilder mit einem Plan-Apochromat-Ölimmersionsobjektiv (63-fache Vergrößerung, numerische Apertur von 1,40) und einer auf -63°C gekühlten iXon 885 EMCCD-Kamera (Andor Technology Ltd., Belfast, Nordirland, Großbritannien). Der Scanbereich der SIM erfasste eine Fläche von $75,56 \times 75,40 \mu\text{m}^2$ und stellte damit eine Anzahl von etwa 20 bis 30 RPE-Zellen pro Lokalisation dar.

In jeder der drei zuvor definierten Regionen wurden Aufnahmereihen zehn benachbarter Zellen von apikal nach basal durch die RPE-Zellkörper (entlang der z-Achse) mit einer Schrittgröße von 100 nm aufgenommen. Der Umfang des Scanbereichs wurde vom ersten apikalen Granulum im Fokus bis zum letzten basalen Granulum innerhalb des Fokus definiert. Jede Aufnahmereihe an einer Lokalisation bestand aus 15 Rohbildern (jeweils fünf Gitterpositionen und drei Rotationen).

Neben der Analyse der Granula war die Bestimmung der Gesamt-AF pro Zelle ein wesentlicher, zu eruiender Faktor. Dazu wurden die RPE-Zellen zusätzlich zur SIM-Bildgebung mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops (Typ Zeiss LSM 780) abgebildet. Diese Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) wurde vor Anwendung der SIM-Bildgebung durchgeführt, da sie zu geringeren Bleicheffekten führte (Reduktion der Gesamt-AF im abgebildeten Bereich um 0,1% für LSM bzw. 5,1% für SIM).

Die Einstellungsparameter des Mikroskops waren einander ähnlich. Die Anregungswellenlänge der LSM betrug 488 nm und die AF-Emission wurde in 24 Kanälen (8,9 nm spektrale Kanalbreite) von 490 bis 695 nm aufgezeichnet. Der Scanbereich umfasste

224,92 × 224,92 μm² und die Durchführung des Scans, die das Granulapolster darstellten, wurden vom apikalen- bis zum basalen RPE in 390-nm-Schritten durchgeführt.

2.4 Bildverarbeitung

Zur weiteren Verarbeitung der Bilder, wurden alle Aufnahmen einer Nachbearbeitung unterzogen, die mit speziellen Algorithmen der internen Software des Zeiss-Geräts (ZEN 2010) erfolgte. Damit konnten hochauflösende Informationen extrahiert und Bilder einer deutlich besseren Qualität rekonstruiert werden. Die Auflösung betrug danach ca. 110 nm lateral. Im Vergleich dazu beträgt die charakteristische Auflösung bei herkömmlichen Bildgebungsmodalitäten, wie der Weitfeld- oder der konfokalen Mikroskopie, ca. 200 nm.

Aus den rekonstruierten SIM-Bildern wurden aus jeder der drei zuvor definierten Lokalisationen zehn benachbarte Zellen ausgewählt. Dieser Vorgang basierte auf der Beurteilbarkeit der Zellgrenzen. Sie stellten sich als kleinste Freiräume zwischen zwei benachbarten Zellen an der basolateralen Seite dar. Vor der Analyse wurden unscharf abgebildete Anteile ohne Granula oder mit unvollständig dargestellten Zellstrukturen entfernt.

Für drei der Spenderaugen (Spenderalter 36, 82 und 88 Jahre) mussten, um die Einhaltung der genannten Aspekte zu gewährleisten, individualisierte Analyseflächen für die fovealen Zellen gewählt werden. Da die Zellgrenzen nicht eindeutig zu identifizieren waren, wurden in diesen Fällen quadratische Areale einer Größe von 169 μm² gewählt, die den Durchschnittswerten aller in unserer Studie analysierten Zellen der Fovea entsprechen (mittlere Fläche aller analysierten Fovealzellen in dieser Studie, 167 ± 46 μm²).

2.5 Computergestützte Analyse der Aufnahmen

Um die aufbereiteten Aufnahmen der Zellen digital verarbeiten und eine Markierung der Granula vorzunehmen zu können, wurde das Programm FIJI [87] eingesetzt und eine Demarkationslinie um jede Zelle gezogen um anschließend die computerunterstützte Analyse über die Zellfläche und -höhe anfertigen zu können (siehe

Abbildung 7). Die Höhenangabe errechnete sich aus der Anzahl der entlang der axialen Dimension (Z-Achse) der RPE-Zellen entstandenen Aufnahmeschichten („Z-Stapel“), die mit der Schrittweite von 100 nm multipliziert wurde.

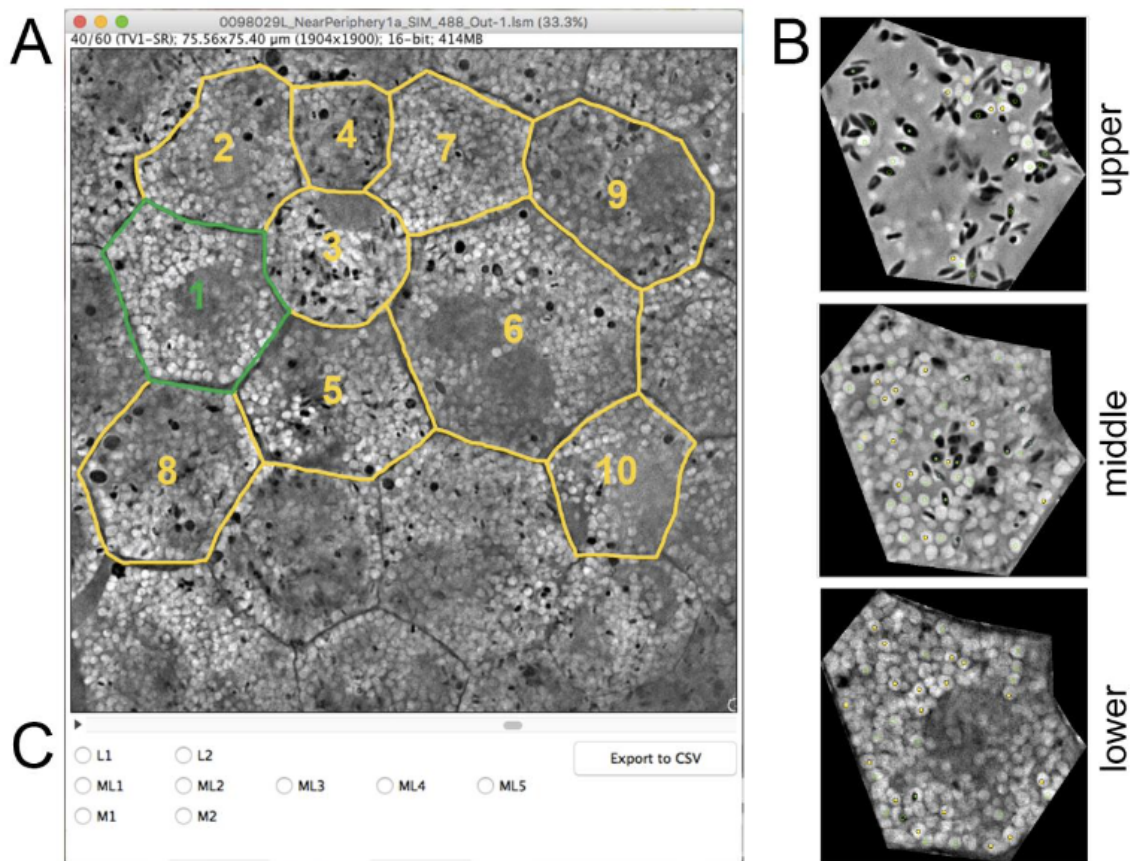


Abbildung 7: Auswahl der RPE-Zellen und Klassifizierung der Granula mit Hilfe des benutzerdefinierten FIJI-Plugins

A: Pro Spender und Lokalisation wurden in jedem SIM-Z-Stapel 10 benachbarte Zellen ausgewählt. Minimale Lücken zwischen den Zellen (in der Regel im basolateralen Bereich) wurden als Zellgrenzen definiert. **B:** Beispielhafte Ausschnitte einer oberen, mittleren und unteren Ebene eines SIM-Z-Stapels. **C:** Im FIJI-Plugin wurden alle definierten Phänotypen aufgeführt. Darstellung einer 83 Jahre alte Spenderin (Nahe Peripherie).

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Zur vereinfachten Differenzierung und optimaler Analyse der intrazellulären Konstellation wurde jeder SIM-Aufnahmestapel in Quartile (Q) unterteilt. Diese Einteilung entstand entlang der Z-Achse von apikal nach basal in Q1-Q4 (siehe Abbildung 5). Die äußeren Grenzen der Quartile 1-3 werden vom ersten apikalen Granulum im Fokus bis zum letzten basalen Granulum innerhalb des Fokus definiert.

Zur anschließenden Analyse der Zellen wurde ein benutzerdefiniertes FIJI-Plugin (TA_Pick_Particles) entwickelt und verwendet, welches freundlicherweise von Prof. Kenneth Sloan (Department of Computer and Information Sciences, University of Alabama at Birmingham, AL, USA) programmiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt

wurde. Mithilfe dieses Plugins wurde eine genaue Markierung der Granula und ihrer Subklassifizierungen ermöglicht.

Alle identifizierbaren Granula der selektierten RPE-Zellen wurden daraufhin manuell markiert und klassifiziert. Basis dieses Vorgangs waren vorab definierte, strukturelle Parameter, die durch zwei entsprechend geschulte Experten durchgeführt wurden. Zum einen erfolgte die Klassifizierung auf Basis des AF-Musters eines jeden Granulums, das sich aus dem AF-Material an der Oberfläche, der AF am Kern, sowie der AF-Intensität zusammensetzte. Zum anderen anhand morphologischer Eigenschaften (Kugel- vs. Spindelform und Größe).

Davon ausgehend wurde das dreidimensionale Zentrum jedes Granulums, das als Punkt der maximalen Dimension definiert wurde, durch systematisches Sichten der einzelnen Schnittbilder der Z-Stapel identifiziert und entsprechend der morphologischen Kategorie klassifiziert.

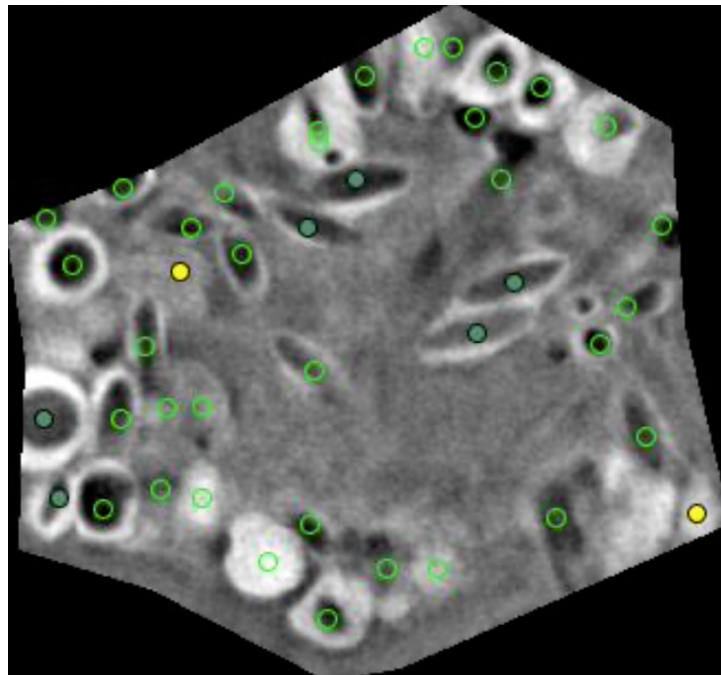


Abbildung 8: SIM-Schnittbild einer RPE-Zelle

Schnittbild (SIM) einer fovealen Zelle eines 47-jährigen Spenders als beispielhafte Darstellung der durchgeführten Schnittbildanalysen mit Hilfe des Programms FIJI und dem benutzerdefinierten Plugin (TA_Pick_Particles). Die hellgrün umrandeten Punkte kennzeichnen gesetzte Markierungen aus den \pm fünf Ebenen. Ausgefüllte Punkte klassifizieren das Granulum und kennzeichnen das dreidimensionale Zentrum (gelb: L, türkis: ML2).

Die Granula stellten sich bei einem mittleren Durchmesser von etwa 1 μm oft über etliche Ebenen hinweg dar. Um bei der dreidimensionalen Markierung Dopplungen der Granula individueller Expansion zu vermeiden, unterlagen diese einem Korrekturmechanismus. Dabei hoben sich bereits markierte Granula in den jeweils fünf vorherigen- und folgenden Ebenen durch eine farbliche Kennzeichnung (hellgrüne Kreise) des FIJI Plugins ab. Zudem wurden unter jeder gesetzten Markierung ein spezifischer Klassifizierungscode des Granulums und die Informationen seiner x-, y- und z-Koordinaten in der Datei der Zelle abgelegt. Diese Informationen wurden für die weitere statistische Analyse benötigt.

Für jede Zelle wurde die Gesamtzahl der Granula pro RPE-Zellkörper angegeben. Diese Zahl ergab sich aus Berücksichtigung der Quartile 1-3, da diese die mit der SIM-Technik sichtbaren Granula-Zonen umfassen, wohingegen Q4 zahlreiche nicht-AF-Mitochondrien enthielt (siehe Abbildung 5) [22, 44].

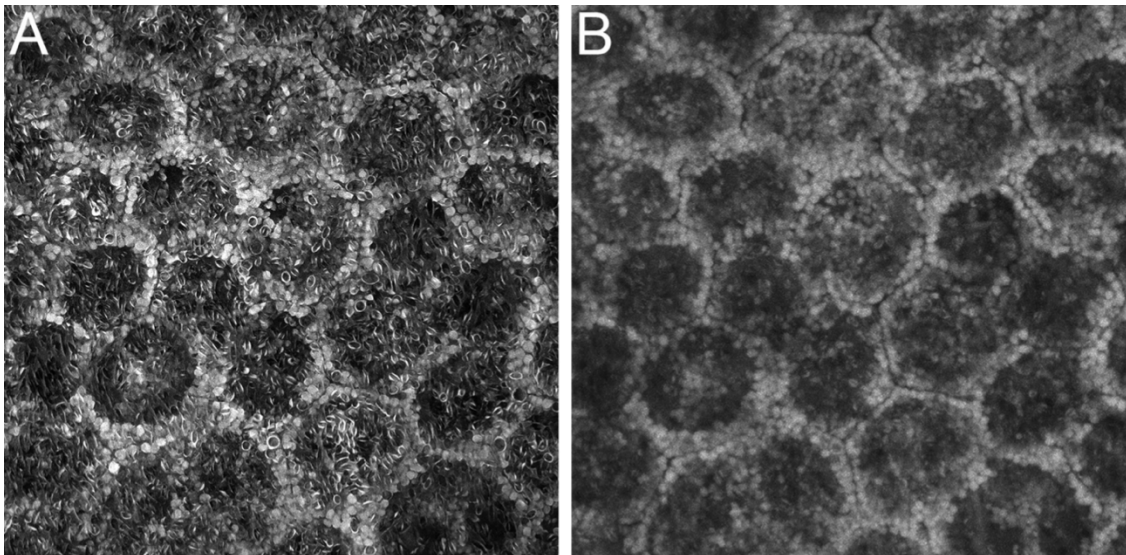


Abbildung 9: SIM- und LSM-Bildgebung von RPE-Zellen

Abgebildet sind Aufnahmen identischer RPE-Zellen aus perifovealen Arealen (Spenderin, 51 Jahre alt): **(A)** SIM, **(B)** LSM.

Relative hypoautofluoreszierende Zentren der RPE-Zellen können auf den hohen Gehalt an Melanosomen und Melanolipofuszin-Granula zurückgeführt werden und stellen nicht ausschließlich die Zellkerne dar.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Durch die zusätzliche Analyse der LSM-Bilder mittels FIJI wurden die SIM-Aufnahmen identischer RPE-Zellen lokalisiert, markiert und anschließend die Gesamt-AF pro Zelle

berechnet. Dieser Vorgang erfolgte in zwei Schritten. Zunächst führte die Addition der Intensitäten aller Pixel, aller Ebenen in der z-Achse und aller Spektralkanäle zu einem summenprojizierten Bild. Anschließend wurde dieser Wert mit den Intensitäten aller Pixel innerhalb dieses Bildes addiert, sodass sich die Gesamt-AF-Intensität der summenprojizierten Zelle ergab.

2.6 Erweiterte Analyse der RPE-Zellkörper

Ergänzend zur computergestützten Analyse wurden RPE-Zellkörper die einen besonders niedrigen bzw. hohen Granulagehalt aufwiesen, sowie eine besonders niedrige oder hohe AF-Intensität hatten, analysiert [88].

Dafür wurden die Daten aller Spender unter Ausschluss derer verwendet, bei denen die Zellgrenzen nicht genau definiert werden konnten (foveale Zellen der Spender im Alter von 36, 82 und 88 Jahren). Zunächst wurde zur Identifikation die Gesamtanzahl der Granula für jede der 420 Zellen bestimmt. Für die weitere Analyse wurden die Zellen verwendet, deren Granulagehalt unterhalb der 5. Perzentile und oberhalb des 95. Perzentils lag. Ergänzend zur Angabe der absoluten Zahlen der M-, ML- und L-Granula wurde für jede Zelle das Verhältnis von M- und ML- zu L-Granula berechnet (>1 : melaninhaltige Granula überwiegen, <1 reine L-Granula überwiegen).

Um Zellen mit hoher oder niedriger AF-Intensität zu bestimmen, wurde die mittlere AF pro Zelle (\pm Standardabweichung) für jeden Standort berechnet. Miteinander verglichen wurden nur jeweils Zellen eines Spenders, da die verwendete Einstellung der LSM-Bildgebung nicht für quantitative AF-Messungen zwischen Standorten unterschiedlicher Spender geeignet war. Einbezogen wurden dann RPE-Zellen mit einer Standardabweichung der AF-Intensität von $\pm 1,5$ bezogen auf die mittlere AF der 10 Zellen jeder der drei Lokalisationen. Für jede Zelle wurde die mittlere AF-Intensität pro Zelle und die Zellfläche (in μm^2) angegeben.

2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurden nichtparametrische statistische Tests verwendet (SPSS 24 für Mac, IBM SPSS Statistics, Chicago, IL). Zur Analyse nicht unabhängiger Daten aus drei Gruppen (d. h. drei Lokalisationen Fovea, Perifovea und nahe Peripherie) wurde der Friedman-Test und eine Post-hoc-Analyse mit dem Dunn-Bonferroni-Test

durchgeführt. Unabhängige Daten aus zwei Altersgruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Der sich daraus ergebende p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde verwendet, um die Reproduzierbarkeit zwischen Prüfern nach der Klassifizierung der Granula innerhalb von zehn Zellen durch die beiden analysierenden Personen zu messen: Korrelation 0,849; $p = 0,004$.

Die Datenerfassung, -organisation und -analyse der erweiterten RPE-Zelluntersuchung erfolgte mit Hilfe von SPSS Statistics und Microsoft Office-Softwarepaketen (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Kategorische Variablen wurden als Zahlen und Prozentsätze, kontinuierliche Variablen als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

3 Ergebnisse

Analysiert wurden 15 RPE-Zell-Präparate von 15 Spenderaugen (acht Spender ≤ 51 Jahre, sieben Spender > 80 Jahre). Jede Probe wurde an drei vorab definierten Stellen, der Fovea, Perifovea und nahe Peripherie mit LSM und SIM abgebildet. Von diesen 45 Teilbereichen wurden insgesamt 450 Zellkörper isoliert dargestellt und ausgewertet. Bei 30 Proben mussten, aufgrund von uneindeutiger Differenzierbarkeit der Zellgrenzen quadratische Ausschnitte präpariert werden, die den Ausmaßen einer durchschnittlichen RPE-Zelle nahekommen. Final konnten in allen Zellen insgesamt 193.096 Granula klassifiziert werden.

Basierend auf charakteristischen AF-Eigenschaften, Größe und Zusammensetzung der RPE-Granula wurde bei der Klassifizierung grundsätzlich zwischen Lipofuszin (L), Melanolipofuszin (ML) und Melanosomen (M) unterschieden. Da die hochauflösenden SIM-Aufnahmen die enorme Varianz der Granula der drei Hauptklassen bezüglich der Form, Größe und AF-Eigenschaften abbildeten, wurde diese Differenzierung durch die vorliegende Arbeit erweitert. Dieser erarbeitete neue Katalog zur Subklassifikation der RPE-Granula ermöglicht als zentrales Ergebnis eine präzisere Interpretation der Granulaverteilung und subzellulärer Mechanismen. Sie benennt neun Phänotypen, die in Abbildung 10 dargestellt sind. Darin konnte in zwei Subtypen des Lipofuszin, fünf Klassifikationen des Melanolipofuszin und zwei Melanosom-Typen unterschieden werden.

Granula Phänotyp	Lipofuszin (L)		Melanolipofuszin (MLF)					Melanosomen (M)	
Subklassifikation	L1	L2	ML1	ML2	ML3	ML4	ML5	M1	M2
SIM-Aufnahme									
Schematische Darstellung									

Abbildung 10: Subklassifikation der Granula

Darstellung der neuen Klassifikation der Granula in neun Phänotypen, sowohl als Ausschnitt einer SIM-Aufnahme, als auch als schematische Zeichnung. Weiße Bildelemente der SIM-Bilder stellen Bereiche mit hoher AF-Intensität dar, dunkle Bildelemente Areale mit niedriger AF-Intensität. Als Iso-AF wurde die durchschnittliche AF-Intensität des Zytoplasmas definiert. Das hier gezeigte Farbkodierungsschema (L: gelb; ML1-3: blau; ML4: violett; ML5: dunkelblau; M: braun) wird für alle nachfolgenden Abbildungen verwendet. Maßstabsbalken: 1 μm .

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Lipofuszin stellte sich in zwei Varianten dar. L1 als einheitliches rundes oder ovales Granulum von geringer Ausdehnung mit homogener AF. Wohingegen L2 als unregelmäßig geformte, lipofuszinähnliche Ansammlung (bzw. L-Konglomerat, > L1) mit irregulären intragranulären AF-Mustern variabel in Erscheinung trat. Es erschien größer als L1 und ließ keine Abgrenzung einzelner Granula zu.

ML1 definierte sich als rundes, ovales oder spindelförmiges Granulum ohne AF-Zentrum mit ununterbrochener AF-Umhüllung unterschiedlicher Dicke, dagegen wies ML2, das ML1 im Grundaufbau ähnelt, deutliche zentrale Hypo- bis Iso-AF aufwies.

ML3 beschrieb Melanolipofuszin mit einer unvollständigen AF-Beschichtung (meist punktförmig oder entlang des halben Granulums). ML4 wurden bullaugenförmige ML-Granula zugeordnet, die sowohl eine deutliche, durchgehende AF-Beschichtung hatten, als auch einen AF-Kern. Große, runde ML-Granula, die mehr als das Doppelte des Volumens eines typischen ML-Granulums hatten und eine AF-Beschichtung aufwiesen, wurden als ML5 definiert.

Reine Melanosomen erschienen in runder (M1) und spindelförmiger Ausprägung (M2). Beide Varianten wiesen bei 488 nm Anregung keine nennenswerten AF-Komponenten auf.

Bei Anwendung der computergestützten Markierung der Granula stellte sich eine optimale Differenzierbarkeit der einheitlichen L1-Granula, der bullaugenförmigen ML4-Granula und der großen ML5-Granula aufgrund der charakteristischen Darstellung heraus. Wegen variabler Erscheinungen des Phänotyps und des inhomogenen Hintergrundes, war es nicht immer möglich, eine eindeutige Unterscheidung zwischen ML1, ML2 und ML3 zu vollziehen. Um die Auswertung der Ergebnisse präzise durchführen zu können, wurden die Zahlen dieser drei Granula-Subtypen zu ML1-3 zusammengefasst. Diesem Schema folgend, konnten in dieser Arbeit mit Ausnahme von lediglich fünf Granula, alle weiteren der neuen Klassifikation zugeordnet werden.

Eine Gesamtzahl von 450 RPE-Zellen wurde digital analysiert und darin insgesamt 193.096 Granula klassifiziert. Die mittlere Anzahl der Granula ergab einen Wert pro Zellkörper (\pm Standardabweichung) von 429 ± 208 . Davon befanden sich in der Fovea 322 ± 115 Granula, 509 ± 198 Granula in den perifovealen Zellen und 456 ± 244 Granula in den Zellen der nahen Peripherie. Der Variationskoeffizient für Granula pro Zelle an einer Stelle lag im Mittel zwischen 20 % (Fovea) und 30 % (nahe Peripherie).

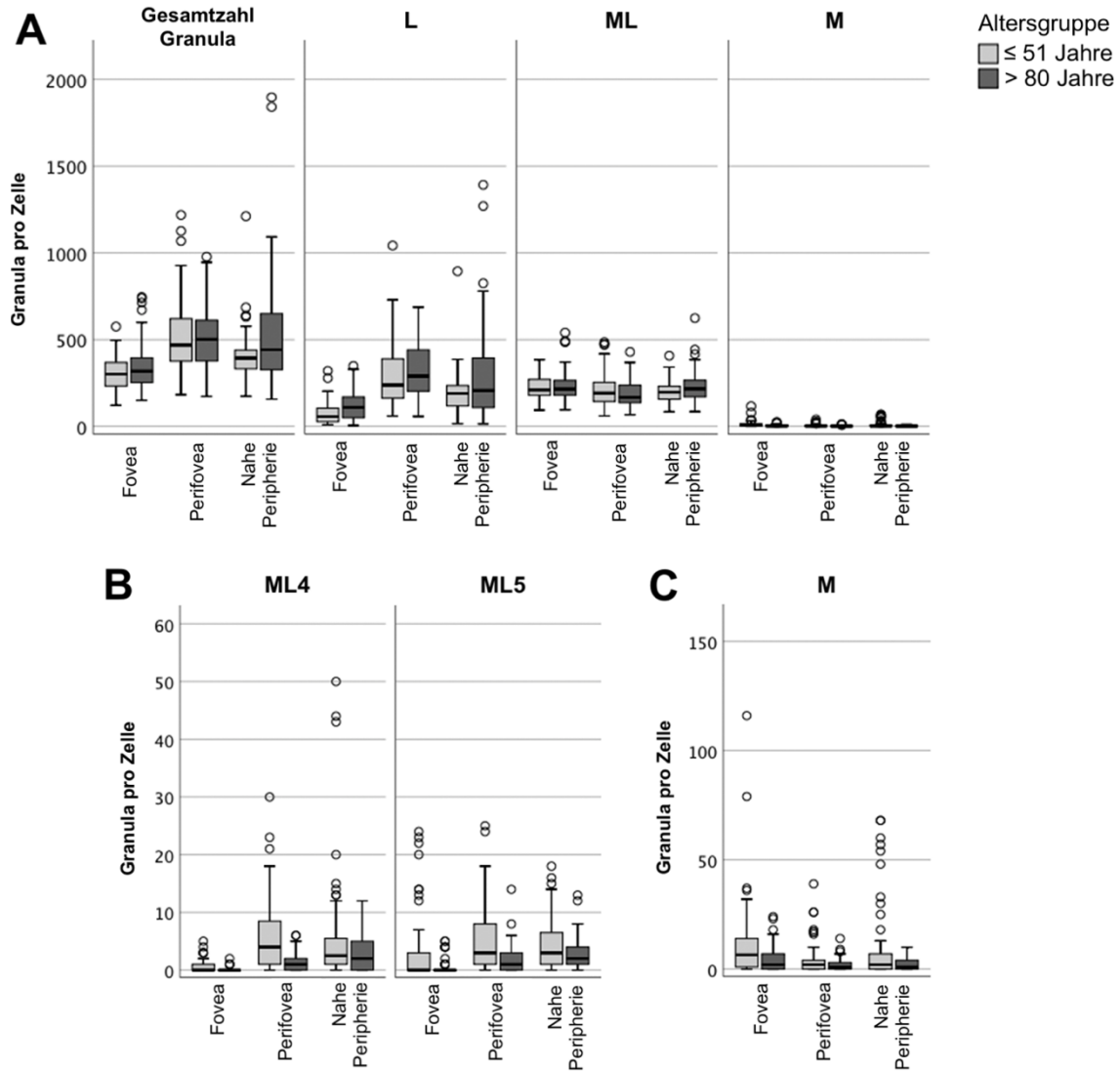


Abbildung 11: Anzahl der Granula pro Zelle

Dargestellt wird die absolute Anzahl der Granula pro RPE-Zelle in der Fovea, Perifovea und nahen Peripherie für Spenderaugen ≤ 51 Jahre und > 80 Jahre.

A: RPE-Zellen enthalten hunderte von Granula in ihren Zellkörpern, wobei die Anzahl mit zunehmendem Alter steigt. Foveale RPE-Zellen enthielten weniger Lipofuszin im Vergleich zu Zellen der anderen Regionen. Einige große Zellen mit mehr als 1000 Granula wurden in der Perifovea und in der nahen Peripherie gefunden. **B:** Die Subtypen ML4 und ML5 waren insgesamt nur in geringer Anzahl vertreten, insbesondere an der Fovea. **C:** Zur besseren Veranschaulichung sind die Melanosomen pro Zelle in einem anderen Maßstab dargestellt. Die geringe Anzahl von Melanosomen könnte durch den Verlust apikaler Bereiche (aufgrund von Präparationsartefakten) oder durch die Tatsache erklärt werden, dass die Charakterisierung ausschließlich auf den AF-Eigenschaften der Granula beruht. Dementsprechend wurden jegliche M, die bei kurzweiliger Anregung AF zeigten, als Melanolipofuszin gezählt.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Tabelle 1: Anzahl der Granula pro Zelle oder Projektionsfläche in der Fovea, Perifovea und nahen Peripherie.

L: Lipofuszin, ML: Melanolipofuszin, M: Melanosomen; M1- und L2-Subtypen wurden nur sporadisch gefunden, sodass diese Zahlen hier nicht separat aufgeführt werden. Signifikante P-Werte wurden hervorgehoben.

Anzahl der Granula pro Zelle (Mittelwert \pm SD)					
Granula	Alter	Fovea	Perifovea	Nahe Peripherie	P
Gesamt	≤ 51 J	307,2 \pm 89,3	509,5 \pm 201,5	399,2 \pm 132,0	<0,001
	> 80 J	339,1 \pm 136,9	508,2 \pm 194,4	521,6 \pm 316,3	<0,001
		<i>P = 0,271</i>	<i>P = 0,815</i>	<i>P = 0,017</i>	
L	≤ 51 J	73,7 \pm 61,0	295,6 \pm 181,7	189,0 \pm 111,5	<0,001
	> 80 J	106,3 \pm 77,9	317,6 \pm 152,1	293,1 \pm 260,9	<0,001
		<i>P = 0,008</i>	<i>P = 0,127</i>	<i>P = 0,034</i>	
ML	≤ 51 J	223,8 \pm 55,9	209,8 \pm 86,1	202,1 \pm 65,9	<0,001
	> 80 J	228,4 \pm 83,5	188,7 \pm 76,4	226,1 \pm 88,4	<0,001
		<i>P = 0,985</i>	<i>P = 0,134</i>	<i>P = 0,090</i>	
M	≤ 51 J	9,8 \pm 17,0	4,1 \pm 6,7	8,1 \pm 16,0	<0,001
	> 80 J	4,4 \pm 5,4	1,9 \pm 2,6	2,3 \pm 3,1	<0,001
		<i>P = 0,018</i>	<i>P = 0,031</i>	<i>P = 0,031</i>	
ML4	≤ 51 J	0,7 \pm 1,3	5,9 \pm 6,2	5,4 \pm 9,0	<0,001
	> 80 J	0,1 \pm 0,3	1,4 \pm 1,6	2,9 \pm 2,9	<0,001
		<i>P = 0,011</i>	<i>P < 0,001</i>	<i>P = 0,072</i>	
ML5	≤ 51 J	2,6 \pm 5,5	5,1 \pm 5,4	4,3 \pm 4,3	<0,001
	> 80 J	0,5 \pm 1,2	1,8 \pm 2,5	2,8 \pm 2,9	<0,001
		<i>P = 0,047</i>	<i>P < 0,001</i>	<i>P = 0,067</i>	

Anzahl der Granula pro Projektionsfläche (Mittelwert \pm SD)					
Granula	Alter	Fovea	Perifovea	Nahe Peripherie	P
Gesamt	≤ 51 J	1,88 \pm 0,38	2,26 \pm 0,44	1,89 \pm 0,38	<0,001
	> 80 J	1,98 \pm 0,56	2,34 \pm 0,55	2,41 \pm 0,99	<0,001
		<i>P = 0,331</i>	<i>P = 0,342</i>	<i>P = <0,001</i>	
L	≤ 51 J	0,44 \pm 0,35	1,27 \pm 0,53	0,87 \pm 0,35	<0,001
	> 80 J	0,62 \pm 0,44	1,45 \pm 0,50	1,31 \pm 0,86	<0,001
		<i>P = 0,007</i>	<i>P = 0,016</i>	<i>P = 0,006</i>	
ML	≤ 51 J	1,38 \pm 0,27	0,97 \pm 0,33	0,97 \pm 0,32	<0,001
	> 80 J	1,34 \pm 0,33	0,88 \pm 0,27	1,10 \pm 0,37	<0,001
		<i>P = 0,222</i>	<i>P = 0,158</i>	<i>P = 0,047</i>	
M	≤ 51 J	0,06 \pm 0,11	0,02 \pm 0,04	0,04 \pm 0,07	<0,001
	> 80 J	0,02 \pm 0,03	0,01 \pm 0,01	0,01 \pm 0,02	<0,001
		<i>P = 0,117</i>	<i>P = 0,030</i>	<i>P = 0,027</i>	
ML4	≤ 51 J	0,004 \pm 0,008	0,028 \pm 0,032	0,028 \pm 0,049	<0,001
	> 80 J	0,001 \pm 0,002	0,006 \pm 0,008	0,013 \pm 0,014	<0,001
		<i>P = < 0,001</i>	<i>P < 0,001</i>	<i>P = 0,08</i>	
ML5	≤ 51 J	0,016 \pm 0,035	0,025 \pm 0,027	0,02 \pm 0,021	<0,001
	> 80 J	0,002 \pm 0,006	0,009 \pm 0,012	0,013 \pm 0,014	<0,001
		<i>P = 0,001</i>	<i>P < 0,001</i>	<i>P = 0,063</i>	

Die Anzahl der Granula wurde in den Kontext der retinalen Lokalisation gestellt. Dabei zeigte sich, dass die mittlere Anzahl der Gesamt-ML pro Zellkörper aller drei Regionen vergleichbare, hohe Werte aufwies. Die zusammengefassten Granula ML1-3 bildeten dabei den wesentlichen Anteil der fovealen Granulatypen und waren damit die alleinig führenden Granula in dieser Region. Darüber hinaus wiesen sie eine relative Konstanz bezüglich ihrer altersabhängigen Entwicklung auf.

Bei einer Betrachtung der mittleren Anzahl der weiteren ML-Granulatypen, ML4 und ML5, zeigte sich, dass diese nur einen geringen Anteil an der Gesamtzahl der RPE-Granula ausmachten und foveal am wenigsten vertreten waren. Ergänzend zeigten diese Subtypen in den Regionen der Fovea und Perifovea einen, mit steigendem Alter, signifikant reduzierten Wert. Diese Beobachtung bestätigte sich auch bei den, ohnehin in geringer Zahl vorkommenden, reinen Melanosomen. Bezogen auf die drei untersuchten Lokalisationen kamen sie hauptsächlich in den fovealen Zellkörpern vor.

Im Kontrast dazu stellten sich die L-Granula dar, die in den fovealen Zellkörpern nur zu einem geringen Anteil zu finden waren. Mit zunehmender Entfernung zur Fovea stieg deren Anzahl, sodass sie im Bereich der Perifovea und in der nahen Peripherie dominierten und ihren Höhepunkt in der Perifovea fanden. Bezüglich der steigenden Gesamtanzahl der L-Granula ließ sich feststellen, dass diese mit zunehmender konischer Exzentrizität und steigendem Alter korrelierte. Die Zunahme in höherem Alter führte dazu, dass sich in der nahen Peripherie das Verhältnis von Lipofuszin zu Melanolipofuszin zugunsten des Lipofuszin verschob. In den Regionen der Fovea und Perifovea blieben die Verhältnisse der Granulatypen in beiden Altersgruppen relativ ähnlich.

L1 hatte einen Anteil von 94.203 Granula (oder 48,8%) der insgesamt ermittelten Granula. Es war hauptsächlich am basolateralen Pol (Q2, Q3) der RPE-Zellen lokalisiert. L2 kam in den RPE-Zellen beider analysierten Alterskohorten nur sporadisch vor (114 von >193.000 Granula; 0,06%).

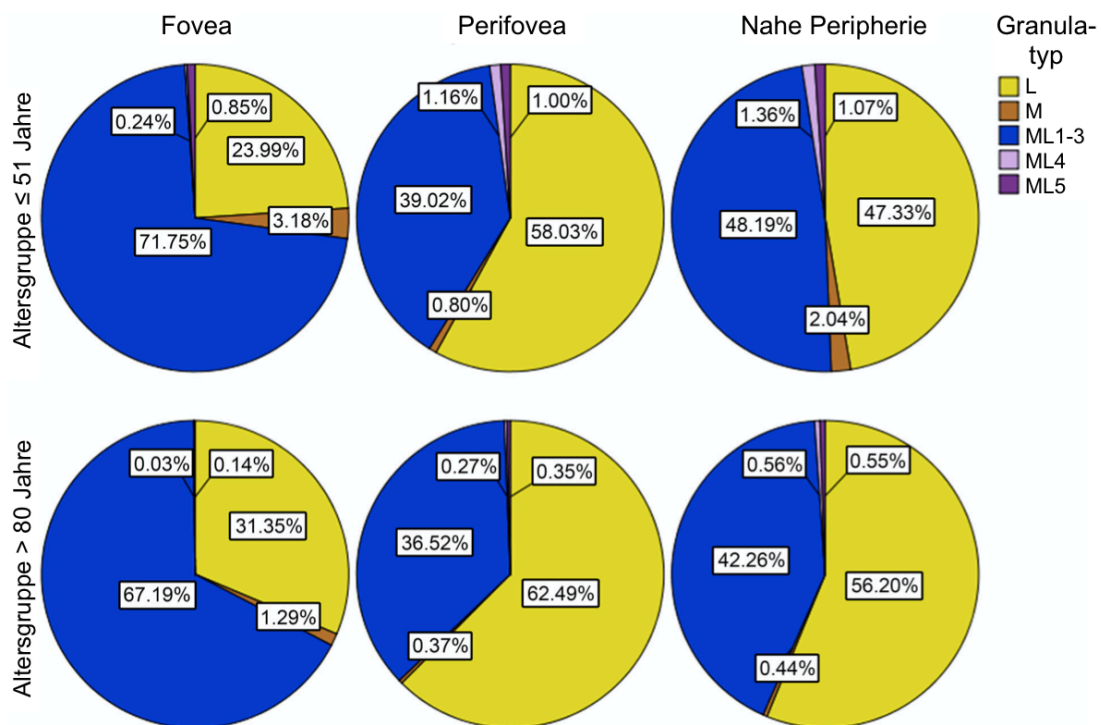


Abbildung 12: Darstellung der prozentualen Verteilung der Granula in der Fovea, Perifovea und der nahen Peripherie

Dargestellt sind die prozentualen Anteile von Lipofuszin, Melanosomen, ML1-3, ML4 und ML5 innerhalb der RPE-Zellkörper. Reines Lipofuszin war in der Fovea nur gering vorhanden und stieg in der Perifovea und der nahen Peripherie an, wobei der Höhepunkt in der Perifovea lag. Führendes Granulum in den Fovealen Zellen war Melanolipofuszin, wobei ML1-3 am häufigsten vorkamen.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Die Auswertung hat zudem gezeigt, dass in den RPE-Zellen hauptsächlich L- und ML-Granula vorkamen. Diese unterschieden sich nicht nur in ihrer Darstellungsform, auch die intrazelluläre Verteilung der Granula folgte einem charakteristischen Muster. Dieses Verteilungsmuster fand sich sowohl in der Betrachtung des Querschnittes als auch in der en-face-Ansicht wieder und unterlag, bis auf die Zunahme des Lipofuszin, keinen signifikanten altersbedingten Veränderungen. Insbesondere die Anzahl der ML-Granula blieb in beiden Altersgruppen stabil.

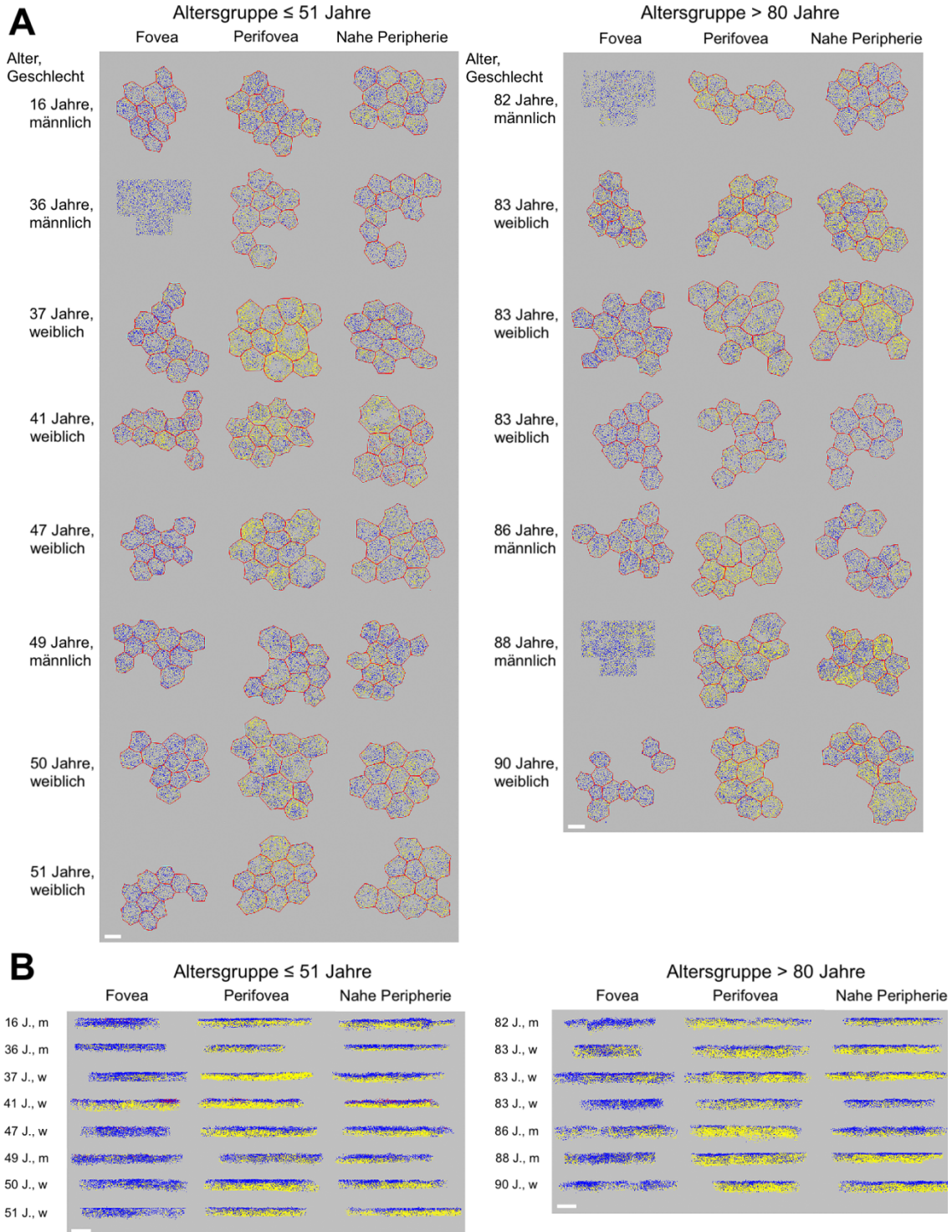


Abbildung 13: Intrazelluläre Granulaverteilung aus zwei Ebenen

Ansicht der intrazellulären Granulaverteilung von vorne und im Querschnitt aller analysierten Zellen, aufgeteilt in Alterskohorten und nach Spender/in. Alter in Jahren (J), Geschlecht: männlich (m), weiblich (w).

A: In der Frontalansicht wird der hohe Gehalt an L-Granula in perifovealen und peripheren Zellen deutlich, während foveale Zellen nur wenige L-Granula enthielten. Lipofuszin war in einigen Zellen eher an den Zellrändern lokalisiert, was auf einen zentral gelegenen Zellkern zurückzuführen

ist. Bei drei männlichen Spendern (36, 82 und 88 Jahre alt) waren die Zellränder der fovealen Zellen in den SIM-Bildern nicht zu erkennen. Daher wurden 10 quadratische Bereiche, die der Größe einer typischen fovealen RPE-Zelle entsprechen, analysiert (siehe Methoden).

B: ML1-3 war im gesamten Gewebe der autofluoreszierenden Organellen innerhalb des RPE-Zellkörpers (Q1-Q3) reichlich nachweisbar; Lipofuszin befand sich jedoch vorwiegend in den basolateralen und basalen Teilen der RPE-Zellkörper (Q2, Q3). Mit zunehmendem Alter nahm die Ablagerung von Lipofuszin zu, insbesondere in der Perifovea und der nahen Peripherie. Die Fovea wies nur wenige L-Granula und viele ML-Granula auf. Nur wenige M waren an der apikalen Seite der RPE-Zellkörper zu sehen (Q1). In den basalen Teilen der RPE-Zellkörper (Q4) sind viele Mitochondrien vorhanden (in der SIM-Autofluoreszenzaufnahme nicht sichtbar). Jedes analysierte Granulum wurde anhand der definierten farblichen Codierung markiert (L: gelb; ML1-3: blau; ML4: violett; ML5: dunkelblau; M: braun). Da es nur wenige M, ML4 und ML5 gab, sind entsprechend wenige violette oder braune Punkte erkennbar. Die roten Linien stellen die Zellgrenzen dar. Maßstabskala: 10 μm .

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

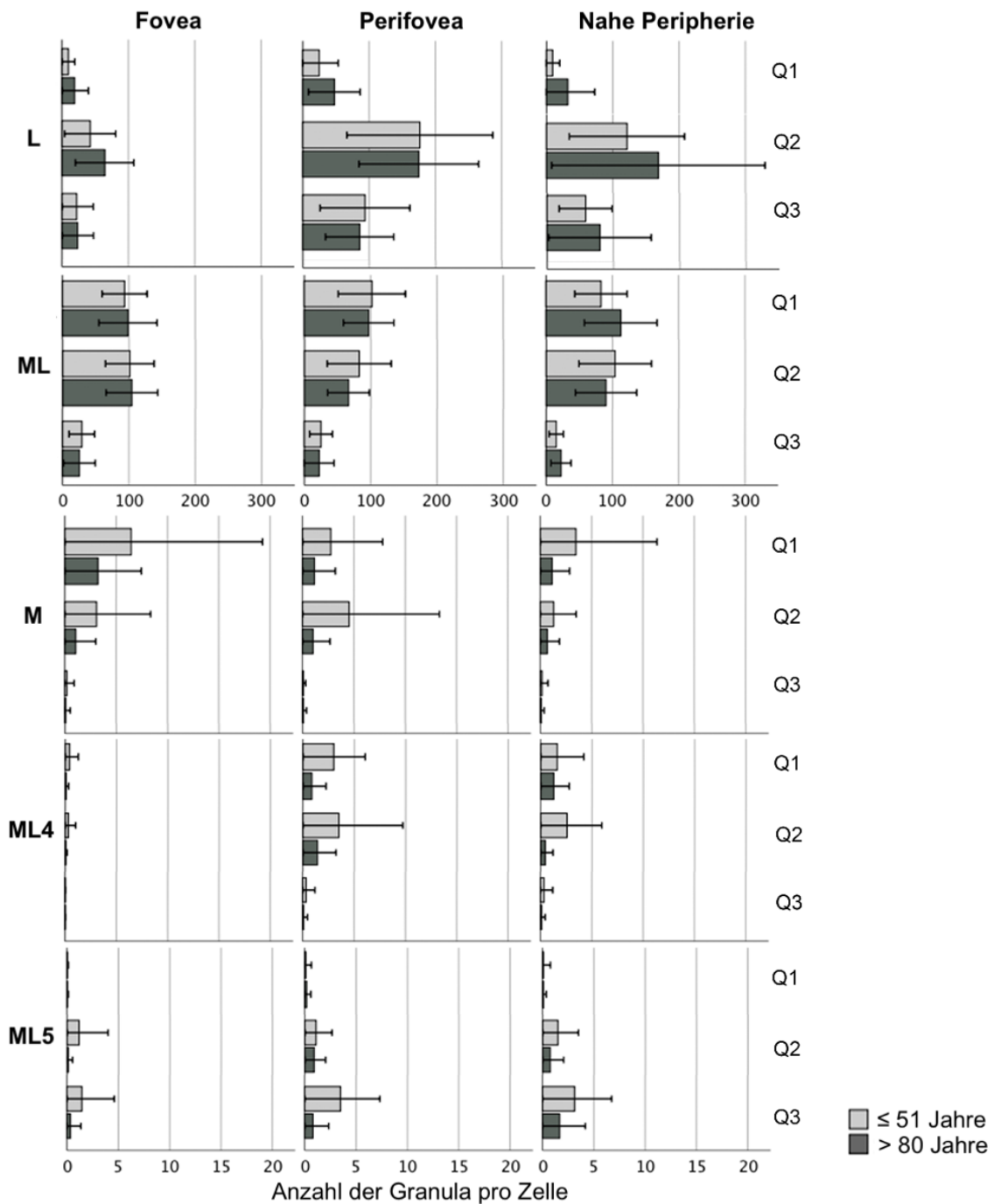


Abbildung 14: Intrazelluläre Granulaverteilung

Die SIM Z-Stapel jeder Zelle wurden in horizontale Quartile (Q1-4) unterteilt (siehe Abbildung 5).

Q1: oben, Q2: Mitte, Q3: unten, Q4: wurde in der Darstellung nicht berücksichtigt, da sich in diesem Areal überwiegend Mitochondrien befanden.

Dargestellt wurde die Anzahl von L, ML, M, ML4 und ML5 in jedem Volumenkompartiment, angegeben nach Lokalisation und Altersgruppe. L wurden hauptsächlich in Q2 nachgewiesen, während ML, M und ML4 in Q1 und Q2 und ML5 in Q2 und Q3 am häufigsten vorkamen.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Das hohe Aufkommen von Melanolipofuszin erstreckte sich über die Ebenen Q1 bis Q3, wobei der Fokus in den apikalen Quartilen 1 und 2 lag. Die seltenen M-Granula waren auf die Ebene des ersten und zweiten Quartils beschränkt. Das Bild der charakteristischen Verteilung trifft auch im Speziellen zu. Der Subtyp ML4 war hauptsächlich apikal in Q1 und Q2 lokalisiert, wohingegen ML5 basal in Q3 zu finden war.

Bei Betrachtung der RPE-Zellen bezüglich ihrer Fläche, zeigten sich nach einer Gegenüberstellung der Altersgruppen vergleichbare Ergebnisse der Abmessungen (≤ 51 Jahre vs. > 80 Jahre: Zellfläche $202 \pm 66 \mu\text{m}^2$ vs. $204 \pm 76 \mu\text{m}^2$; Zelldurchmesser $16 \pm 2 \mu\text{m}$ vs. $16 \pm 3 \mu\text{m}$). Unterschiede in den Größen der Zellen sind aufgrund regionaler Differenzen zu erkennen. So waren die fovealen Zellen bei allen Spendern deutlich kleiner als Zellen der Perifovea oder der nahen Peripherie. Foveale Zellen hatten eine Zellfläche von $167 \pm 46 \mu\text{m}^2$ (äquivalenter Durchmesser: $14 \pm 2 \mu\text{m}$). Die Fläche perifovealer Zellen betrug $221 \pm 70 \mu\text{m}^2$ (äquivalenter Durchmesser: $17 \pm 3 \mu\text{m}$), in der nahen Peripherie ergaben sich Werte von $215 \pm 77 \mu\text{m}^2$ (äquivalenter Durchmesser: $16 \pm 2 \mu\text{m}$).

Um eine subzelluläre Grundlage zur besseren Interpretierbarkeit der klinischen FAF zu schaffen, wurden die dreidimensionalen RPE-AF-Daten in ein zweidimensionales en-face-Projektionsbild transformiert. In dieser Ansicht war zudem die Granuladichte beurteilbar (Anzahl Granula pro Projektionsfläche).

Diese Untersuchungen ergaben, dass die Gesamtdichte der Granula im Bereich der Perifovea am höchsten war ($2,3 \pm 0,5$ pro μm^2). Ergänzend konnte mit dieser Analyse die Erkenntnis gewonnen werden, dass die Anzahl der Granula in direktem Zusammenhang zur Zellgröße stand. Sie stieg mit zunehmender Zellgröße in allen Regionen und Altersgruppen gleichermaßen an. Foveale Zellen waren kleiner als RPE-Zellen der Perifovea oder nahen Peripherie und hatten geringere Werte hinsichtlich der Gesamtanzahl der Granula. Dabei wiesen Zellen von Spendern eines höheren Alters eine starke Variabilität der Zellgrößen auf. Hinsichtlich jüngerer Altersgruppen konnte diese Beobachtung nur bei Zellen der Perifovea und nahen Peripherie geteilt werden. Foveale Zellen wiesen diesbezüglich ein konstantes, enges Intervall auf.

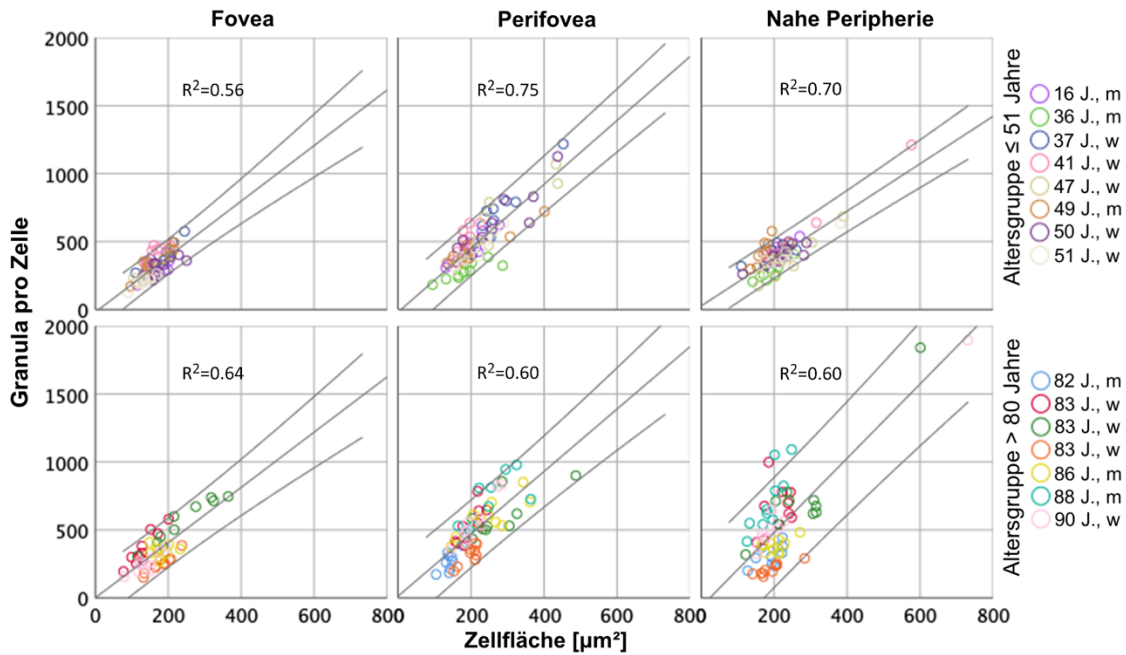


Abbildung 15: Zellfläche und Anzahl der Granula pro Zelle

Darstellung des Zusammenhangs zwischen Zellfläche und Anzahl der Granula pro Zelle aufgeteilt in die beiden Altersgruppen und den drei Lokalisationen. Alter in Jahren (J), Geschlecht: männlich (m), weiblich (w)

Die Gesamtzahl der Granula pro Zelle nahm in beiden Altersgruppen und an allen Orten mit zunehmender Zellfläche zu. Foveale Zellen waren kleiner ($175 \pm 53 \mu\text{m}^2$) und enthielten insgesamt weniger Granula ($322,1 \pm 114,7$). Zellen in der Perifovea und der nahen Peripherie nahmen eine größere Fläche ein (Perifovea, $225 \pm 74 \mu\text{m}^2$; nahe Peripherie, $218 \pm 73 \mu\text{m}^2$) und beinhalteten damit auch eine höhere Anzahl an Granula (Perifovea, $508,9 \pm 197,5$; nahe Peripherie, $456,3 \pm 243,6$). Zudem wiesen sie eine höhere Variabilität der Granulamenge auf als foveale Zellen. Die Regressionslinien und 95 %-Konfidenzintervalle sind für beide Altersgruppen für jeden Ort angegeben.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Die Korrelation der Zellgröße und Granuladichte wirkte sich auch auf die AF der RPE-Zelle aus. Demnach stieg die Gesamt-AF pro Zelle mit zunehmender Anzahl an Granula. Bei einem Vergleich der Gesamt-AF pro Zelle mit der Granula-Anzahl pro Zellkörper ließen sich keine Alterungseffekte feststellen. Es stellte sich jedoch eine erhöhte AF-Varianz zwischen den Bereichen Perifovea und naher Peripherie, verglichen mit der Fovea, dar.

Bei der erweiterten Betrachtung der RPE-Zellkörper mit besonders niedrigem Granulagehalt (unter der 5. Perzentile) wurden 21 Zellen analysiert. Diese wurden überwiegend in der Altersgruppe der unter 80-Jährigen (14 der 21 Zellen) gefunden. Zudem stammten acht der 21 Zellen von dem gleichen Spender (83 J., w). Der niedrige Granulagehalt betraf insbesondere foveale Zellen (11 Fovea, 4 Perifovea, 6 nahe der Peripherie). Meist

ging die geringe Granuladichte mit einer kleinen Zellfläche einher. Zudem wiesen diese Zellen durchweg ein hohes M- und ML- zu L-Verhältnis (> 1) auf, was ein überwiegendes Vorhandensein der melaninhaltigen Granula bedeutet.

RPE-Zellen mit einem besonders hohen Granulagehalt (über dem 95. Perzentil, betraf 21 Zellen) wurden ebenfalls überwiegend in der Altersgruppe der über 80-jährigen und in der Perifovea gefunden. Auffällig war, dass keine Zellen in der Fovea gefunden wurden (0 Fovea, 14 Perifovea, 7 nahe der Peripherie). Zudem stammten sechs der 21 Zellen von demselben Spender (88 J., m). Gekennzeichnet waren RPE-Zellen mit einem hohen Granulagehalt durch eine große Zellfläche und ein niedriges (M+ML)/L-Verhältnis. Diese Zellen enthielten, verglichen mit einer durchschnittlichen RPE-Zelle, etwa doppelt so viele Granula, bezogen auf die Zellen unterhalb des 5. Perzentils sechsmal so viele.

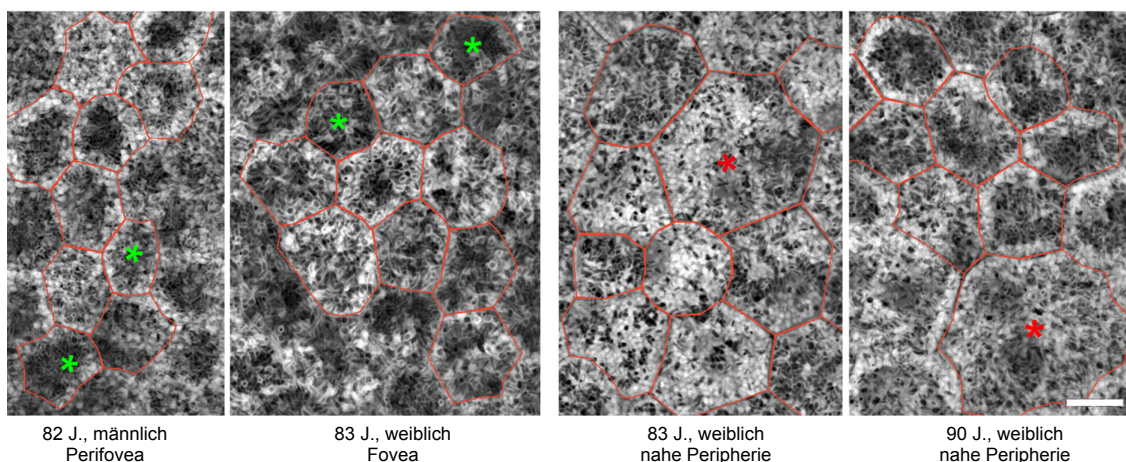


Abbildung 16: RPE-Zellen mit besonders geringem bzw. hohem Granulagehalt

Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie von Zellen des RPE mit auffallend niedrigem bzw. hohem Granulagehalt verschiedener Spender und Regionen. Die farbigen Sterne markieren die Zellen mit besonders geringer (grün) und hoher (rot) Granula-Anzahl. Die roten Umrandungen markieren die Zellgrenzen einzelner RPE-Zellen. Maßstabskala: 10 μ m.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Die analysierten RPE-Zellen, deren AF-Intensität 1,5 Standardabweichungen unter oder über dem AF-Mittelwert der jeweiligen Lokalisation lag, wurden als Zellen mit auffallend niedriger bzw. hoher AF-Intensität definiert. Demnach konnten 20 Zellen einer niedrigen- und 28 Zellen einer besonders hohen AF-Intensität zugeordnet werden.

RPE-Zellen mit einer niedrigen AF-Intensität enthielten insgesamt etwa 300 Granula ($316,5 \pm 127,9$) und wurden an allen drei Lokalisationen gefunden (5 Fovea, 6 Perifovea,

9 nahe Peripherie). Zudem waren sie auf beide Altersgruppen gleichmäßig verteilt (10 ≤ 51 Jahre, 10 > 80 Jahre). Erweitert charakterisiert wurden sie durch ein hohes M-/ML- zu L-Verhältnis an allen drei Orten. Zudem fiel auf, dass foveale- und perifoveale RPE-Zellen mit geringer AF-Intensität bezogen auf ihre Zellfläche kleiner waren, als eine durchschnittliche RPE-Zelle, wohingegen die Zellen der nahen Peripherie vergleichbare Werte aufwiesen.

An allen drei Orten kamen Zellen mit besonders hoher AF-Intensität vor (8 Fovea, 9 Perifovea, 11 nahe Peripherie), die insgesamt etwa 500 Granula ($499,6 \pm 359,3$) enthielten und deren Zellflächen der einer jeweiligen Lokalisation einer durchschnittlichen RPE-Zelle entsprachen. Diese Zellen waren in beiden Altersgruppen vertreten (13 ≤ 51 Jahre, 15 > 80 Jahre) und zeichneten sich durch ein geringes M-/ML- zu L-Verhältnis aus.

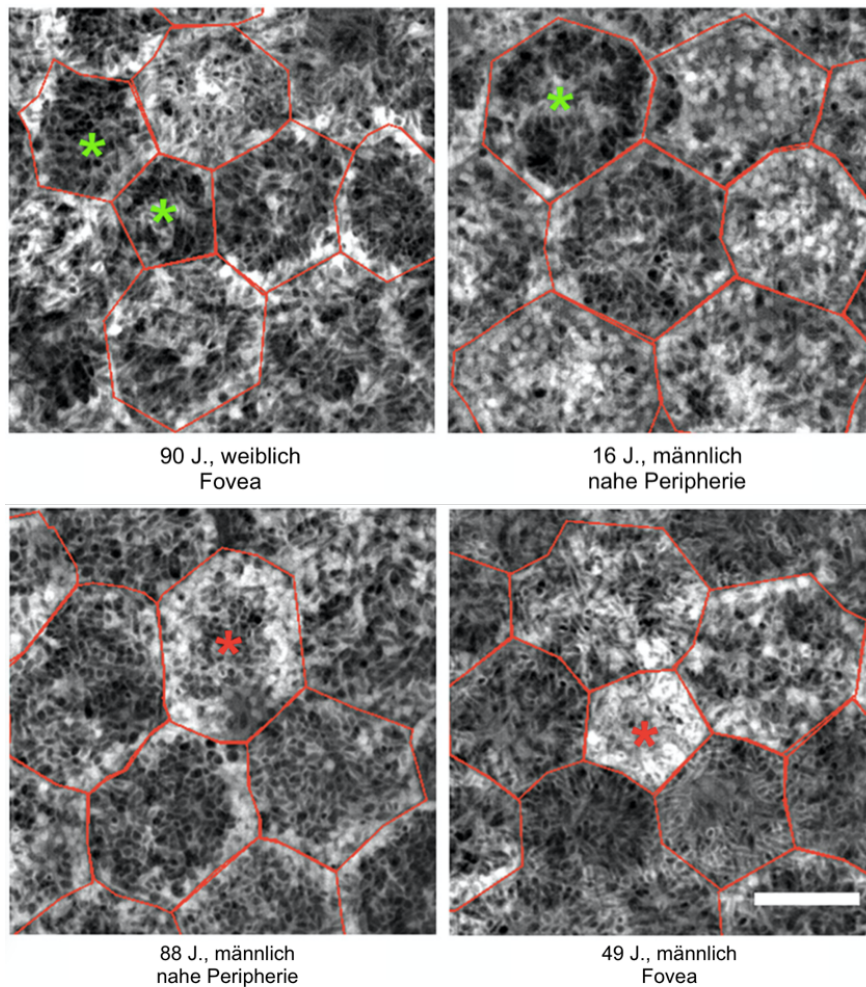


Abbildung 17: RPE-Zellen mit besonders niedriger bzw. hoher AF-Intensität

Strukturierte Beleuchtungsmikroskopie von Zellen des RPE mit besonders niedriger bzw. hoher AF-Intensität. Die farbigen Sterne markieren die Zellen mit besonders geringer- (grün) und hoher (rot) AF-Intensität. Die roten Umrandungen markieren die Zellgrenzen einzelner RPE-Zellen. Maßstabskala: 10 μ m.

Eigene Darstellung aus Bermond et al., 2020 [46].

Tabelle 2: Merkmale von RPE-Zellen mit extremen Granulawerten und Autofluoreszenz-Intensitäten.

L: Lipofuszin; ML: Melanolipofuszin; M: Melanosomen. (M+ML)/L-Verhältnis: >1 wenn melaninhaltige Granula überwiegen, <1 wenn reine L-Granula überwiegen. AF: Autofluoreszenz.

Lokalisation	Altersgruppe	Charakteristika	RPE-Zellen mit				RPE-Zellen gesamt
			niedrigem Granulagehalt	hohem Granulagehalt	niedriger AF-Intensität	hoher AF-Intensität	
Fovea	≤ 51 Jahre	Anzahl der Zellen	n=5	n=0	n=2	n=6	n=70
		Fläche [μm^2]	112,0 ± 18,5	k.A.	116,0 ± 26,9	143,0 ± 42,6	162,3 ± 34,4
		(M+ML)/L-Verhältnis	7,2 ± 5,7	k.A.	14,3 ± 7,5	2,8 ± 1,9	5,9 ± 5,4
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	148,8 ± 19,3	k.A.	231,0 ± 66,9	177,7 ± 65,9	191,4 ± 39,4
	> 80 Jahre	Anzahl der Zellen	n=6	n=0	n=3	n=2	n=50
		Fläche [μm^2]	112,2 ± 35,5	k.A.	117,0 ± 18,5	181,0 ± 36,8	172,3 ± 57,8
		(M+ML)/L-Verhältnis	15,8 ± 13,4	k.A.	10,3 ± 11,9	2,1 ± 1,4	4,9 ± 6,6
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	177,2 ± 77,4	k.A.	143,3 ± 20,6	201,3 ± 89,3	204,7 ± 53,1
Perifovea	≤ 51 Jahre	Anzahl der Zellen	n=1	n=6	n=3	n=2	n=80
		Fläche [μm^2]	94,3	403,3 ± 62,5	157,7 ± 20,7	250,0 ± 2,8	224,7 ± 74,3
		(M+ML)/L-Verhältnis	1,4	0,6 ± 0,3	1,8 ± 0,3	0,2 ± 0,1	1,0 ± 0,8
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	193,1	248,3 ± 26,2	224,0 ± 3,9	303,1 ± 21,8	236,2 ± 36,0
	> 80 Jahre	Anzahl der Zellen	n=3	n=8	n=3	n=7	n=70
		Fläche [μm^2]	144,1 ± 7,6	317,9 ± 73,8	143,7 ± 11,0	204,1 ± 47,7	215,9 ± 65,6
		(M+ML)/L-Verhältnis	1,8 ± 0,9	0,5 ± 0,2	1,6 ± 1,1	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,4
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	127,7 ± 4,3	283,8 ± 45,7	178,8 ± 87,1	247,5 ± 45,5	230,4 ± 52,6
Nahe Peripherie	≤ 51 Jahre	Anzahl der Zellen	n=1	n=1	n=5	n=5	n=80
		Fläche [μm^2]	437,3	576,5	194,8 ± 48,3	182,2 ± 56,6	214,0 ± 63,4
		(M+ML)/L-Verhältnis	10,5	0,4	2,5 ± 1,8	0,8 ± 0,4	1,6 ± 1,4
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	39,6	210,1	221,3 ± 57,2	217,9 ± 62,0	194,0 ± 36,4
	> 80 Jahre	Anzahl der Zellen	n=5	n=6	n=4	n=6	n=70
		Fläche [μm^2]	168,3 ± 19,2	365,5 ± 237,3	200,3 ± 61,8	276,2 ± 217,8	215,1 ± 89,7
		(M+ML)/L-Verhältnis	3,7 ± 3,7	0,5 ± 0,3	4,0 ± 4,2	0,6 ± 0,3	1,5 ± 1,6
		Granula pro Zellfläche [x/100 μm^2]	106,1 ± 12,3	405,1 ± 114,3	175,8 ± 79,0	280,5 ± 163,4	228,6 ± 87,4

4 Diskussion

Durch die vorliegende Arbeit konnten Daten von mehr als 193.000 menschlichen AF-RPE-Granula erhoben werden, die Aufschluss über subzelluläre Prozesse der Retina geben. Dabei bildete sich deutlich ab, dass die Granula in den RPE-Zellkörpern sowohl diverse AF-Phänotypen, als auch charakteristische intrazelluläre Verteilungsmuster aufweisen. Diese stellten sich in einer Abhängigkeit zur Netzhautlokalisation und des dort dominanten Photorezeptortyps dar.

Die zur präzisen Analyse erforderliche hochauflösende Darstellung der RPE-Zellen wurde mit Hilfe der strukturierten Beleuchtungsmikroskopie (structured illumination microscopy, SIM) ermöglicht. Diese kombinierte eine hohe strukturelle Auflösung mit der Fähigkeit zur Abbildung autofluoreszierender Eigenschaften [50, 89]. Die auf dem AF-Muster und Morphologie der intrazellulären Granula basierende Differenzierung in die drei Klassen Lipofuszin, Melanolipofuszin und Melanosomen [41], ließen sich durch diese optimierte Bildgebung weiter unterteilen. Es konnten neun unterschiedliche Phänotypen isoliert werden.

Ergänzend ist darauf hinzuweisen, dass Pollreis et al. im Jahr 2018 eine Klassifikation vorstellten, die unter Verwendung der Elektronenmikroskopie (EM) entwickelt wurde. Bei diesen *ähnlichen* RPE-Zell-Analysen wurde das deutlich autofluoreszierende Lipofuszin als „eine vielfältige Kategorie, die durchaus in weitere Granulatypen unterteilt werden kann“ [44] beschrieben. Die EM ist demnach – und hier liegt der maßgebliche Unterschied - im Vergleich zur Bildgebung mittels SIM nicht in der Lage, AF-Merkmale darzustellen. Diese Eigenschaft stellt sich als grundlegend für die erweiterte Differenzierbarkeit der Granula, insbesondere des stark autofluoreszierenden Lipofuszin oder der diversen Subklassifizierungen des Melanolipofuszin, dar. Folglich bestehen zumindest Zweifel in der direkten Vergleichbarkeit der bildgebenden Verfahren. Um eine entsprechende Interpretierbarkeit ermöglichen zu können, wären zukünftige Studien wünschenswert, die unter Verwendung dieser beiden Techniken (EM und SIM) die Granula derselben Zellproben visualisieren. Interessante grundsätzliche Erkenntnisse aus der o.g. Studie decken sich mit den von uns ermittelten Daten zur Anzahl und Verteilung der Granula pro RPE-Zelle.

Betrachtet man die neu definierte Granula-Klassifizierung der vorliegenden Arbeit, so wird Lipofuszin nun in zwei Varianten unterschieden, L1 und L2. Dabei stellt sich L1 als reines L-Granulum dar und L2 als dicht gepackte Konglomerate.

Lipofuszin reichert sich mit zunehmendem Alter in einigen Geweben des Körpers an. Es wird als nicht abbaubares Material im lysosomalen Kompartiment von sich nicht-teilenden Zellen verstanden [53, 90]. Dabei entsteht es intern über Autophagie [91]. Dieser Syntheseprozess konnte bei den L-Granula des RPE nicht nachgewiesen werden. Daher wird die Rolle des Lipofuszin in diesen Zellen stets kontrovers diskutiert. Frühere Studien gingen davon aus, dass die Akkumulation des Lipofuszin mit zunehmendem Alter in einem Zusammenhang mit der Lichtexposition steht [41]. Neuen Erkenntnissen zufolge fällt das Lipofuszin der RPE-Zellen im Phagozytoseprozess der Photorezeptor-Außensegmente an und wird in Lysosomen innerhalb der RPE-Zellkörper gespeichert [92].

Wichtig ist die Differenzierung des sich anreichernden Lipofuszin in den RPE-Zellen. In Studien wurden kürzlich intrazelluläre L-Granula-Aggregate beschrieben, die ausschließlich in AMD-Augen gefunden werden [93]. Der dort stattfindende Aggregationsprozess unterliegt einer Umverteilung und Verdichtung von zellulären AF-Anteilen, die dazu neigen, aus der Zelle in das unter dem RPE liegende basale Kompartiment abgegeben zu werden. Der damit einhergehende Verlust kann im fortgeschrittenen pathologischen Verlauf zu reduzierten Werten der Gesamt-AF der RPE-Zellen führen, wie sie bei diesen von AMD-Augen sowohl ex-vivo [54], als auch in vivo gezeigt werden konnte [43, 55].

Als besonders auffällig stellte sich heraus, dass L-Granula in fovealen Bereichen, trotz hoher Stoffwechselaktivität der dort lokalisierten RPE-Zellen, nur in sehr geringer Anzahl nachgewiesen werden konnten. Diese Werte ($L \leq 51$ Jahre 73.7 ± 61.0 , > 80 Jahre 106.3 ± 77.9) stiegen mit zunehmender Entfernung zur Fovea an. Dies könnte auf einen spezifischen Metabolismus der Photorezeptoren, insbesondere der dort hauptsächlich lokalisierten Zapfen, zurückzuführen sein [94, 95]. Dieser signifikant auftretende Zusammenhang zwischen Phänotypen und der jeweiligen Retina-Lokalisation, sowie der dort dominierenden Photorezeptortypen, wird ebenso durch die Häufung der foveal vorherrschenden ML-RPE-Granula deutlich [42].

Auf Grundlage dessen besteht Grund zu der weiteren Annahme, dass diese photorezeptorspezifische Unterscheidung der Stoffwechselmechanismen in einem Zusammenhang mit der indifferenten Distribution der Photorezeptortypen stehen könnte, denn das Verhältnis von Zapfen zu Stäbchen befindet sich in einem Ungleichgewicht (vgl. ca. 7 Mio. vs. 120 Mio. [19]). Dieses verschiebt sich, mit zunehmender Entfernung von der Fovea, bis zu einem Faktor von 20:1 zugunsten der Stäbchen. Vor diesem Hintergrund gilt es in

kommenden Studien die feststehende Beteiligung der Müller-Zellen an dem Zapfen-spezifischen Sehzyklus [95] genauer zu betrachten, die zu einer Reduktion des anfallenden Materials in diesem Bereich beitragen könnte.

Weitere durch die vorliegende Studie erstmals definierte Varianten sind die Typen 4 und 5 des Melanolipofuszin. Diese konnten fast ausschließlich in Regionen außerhalb der Fovea klassifiziert werden. Dabei kam ML4 mit einem Anteil von 0,66% (1271 von >193.000 Granula) an der Gesamtzahl der Granula der RPE-Zellen in den apikalen Arealen vor. Es handelt sich um Melanolipofuszin mit einem autofluoreszierenden Kern. Melanolipofuszin Typ 5 (ML5; 1314 von >193.000 Granula oder 0,68%) befand sich am basolateralen Pol und trat als deutlich vergrößertes ML-Granulum in Erscheinung. Kontär zur Entwicklung der L-Granula, reduzierte sich die Anzahl des ML4 und 5 mit zunehmendem Alter. Der aktuelle Wissensstand lässt allerdings noch keine weitere Interpretation der Bedeutung dieser beiden Granula zu.

Mit Blick auf die Fragestellung, inwieweit sich entwickelnde und reifende Augen bezüglich ihrer AF unterscheiden, konnte durch histologische Untersuchungen gezeigt werden, dass von Geburt an zunächst nur Melanosomen in den RPE-Zellen vorhanden sind [40, 96]. L-Granula waren bei Kindern unter 10 Jahren nur in sehr geringer Anzahl nachweisbar. Allerdings wurde innerhalb der ersten zwei Lebensjahre, entgegen der Annahme, eine AF registriert [97, 98].

Weitere Untersuchungen bezüglich der Quelle dieser AF wurden von Feeney-Burns 1978 durchgeführt und damit ein Modell zur Entstehung und Phagozytose von AF-Granula in humanen RPE-Zellen vorgestellt. Es wurde gezeigt, dass AF-Material altersunabhängig in RPE-Phagolysosomen vorkommt [41]. In diesem Kontext formulierte sie die Hypothese, dass lipoides Material bei Kindern eines Alters <1 Jahr die Hauptquelle der AF sei, das innerhalb sekundärer Lysosomen (Melanolysosomen) entsteht. Die Entstehung von L-Granula könnte daher eine direkte Folge dessen sein [40, 41]. Es ist davon auszugehen, dass die Abwesenheit des Lipofuszin in dieser Altersgruppe auf der Unreife der Fovea zum Zeitpunkt der Geburt basiert. Mit der Entwicklung der Retina in der ersten Lebensdekade und der damit verbundenen Verdichtung der Photorezeptorzellen im Bereich der Fovea [99, 100] geht auch eine Zunahme von nicht abbaubarem Material und Lipofuszin einher.

Feeney-Burns nahm zu dieser Zeit an, dass dieses Phänomen mit einer erhöhten Lichtexposition korreliert. In den vergangenen Jahren entstandene Studien konnten diese

Annahme widerlegen [52, 101]. Demnach ist die Akkumulation des AF-Materials vor allem von den Photorezeptor-Außensegmenten der Stäbchen abhängig [52], dabei insbesondere von nicht abbaubarem all-trans- und 11-cis-Retinal [101].

Unabhängig von diesen Erkenntnissen enthalten die Veröffentlichungen von Feeney-Burns keine Hinweise bezüglich der exakten untersuchten fovealen Lokalisation. Daher kann auf dieser Grundlage keine ausreichende Konklusion zwischen einer charakteristischen Verteilung der Photorezeptoren und deren Korrelation mit der Akkumulation des Lipofuzin formuliert werden.

Zu Beginn der vorliegenden Studie wurde auf Basis der AF-Eigenschaften intrazellulärer Granula die Hypothese formuliert, dass Granula einer stetigen Entwicklung unterliegen und damit in diversen Stadien und Übergangsstadien vorkommen. Dabei könnten ML-Granula ein Zwischenstadium darstellen, deren Ursprung in reinen M-Granula zu finden ist. Danach könnten sich frühe Stadien der ML-Granula als reine M mit einer marginalen AF darstellen, die sich im weiteren Verlauf zunächst zu ML-Granula mit deutlich sichtbarem AF-Anteil entwickeln und sich anschließend als reines Lipofuzin etablieren. Erklärt werden könnten diese Prozesse durch in vitro nachgewiesene destruktive oxidative und/oder photo-oxidative Mechanismen [102].

Alternative Ergebnisse gehen aus weiteren Arbeiten, wie der von Biesemeier et. al hervor. Sie konnten keine Korrelation der chemischen Zusammensetzung zwischen reinen L-Granula und AF-Material in Melanolipofuzin feststellen [103]. Diese Erkenntnisse vertreten, entgegen der von uns aufgestellten Hypothesen, die These, dass es sich beim Lipofuzin um ein de novo entstandenes Granulum handelt, dessen Entwicklung unabhängig von M/ML-Granula erfolgt.

Dennoch lassen sich Zweifel an der These von Biesemeier et. al formulieren, wenn man die Tatsache betrachtet, dass bisher keine sich entwickelnden L-Granula von nur wenigen hundert Nanometern Größe beschrieben werden konnten. Die finale Größe der L-Granula entspricht mit durchschnittlich 1 μm etwa der eines reinen M-Granulums. Diese enge Größenkorrelation spricht für die, in der vorliegenden Arbeit diskutierten Hypothese der stetigen Entwicklung der Granula und dem Vorhandensein eines Fusionsmechanismus. In diesem Kontext sollte zudem erwähnt werden, dass die Bildung von Lipofuzin mit Melanosomen zusammenhängen kann, nicht aber unabdingbar mit Melanin. Diese Annahme lässt sich durch die Anwesenheit von Melanosomen in RPE-Zellen von Menschen mit Albinismus [104], die zudem eine hohe Reflexion aufweisen [105, 106], bestärken. Abhängig von der Mutationsart können Menschen mit Albinismus Defekte an

der Melanogenese oder der Organellogenese haben, wodurch zwei, voneinander unabhängige Prozesse beeinflusst werden.

Präzise Analysen der RPE-Granula bezüglich ihrer Klassifikation und Anzahl, sowie ihre hochaufgelöste bildliche Darstellung waren bislang nur spärlich vorhanden [40, 44]. Unter diesem Aspekt ergänzen die Daten aus der vorliegenden Untersuchung das Wissen über die intrazellulären Veränderungen, altersspezifische Entwicklungen und nicht zuletzt das Gesamtgeschehen der AF-Granula in den RPE-Zellen.

Basis der aktuellen Analysen waren RPE-Zellen, die eine regelmäßige, scharf definierbare, polygonale Geometrie aufwiesen. Zudem ergab die Epifluoreszenz- und Transmissionsmikroskopie der Spenderaugen vor Präparation der RPE-Proben Auskunft über den Gesundheitszustand der Retina, wodurch Netzhaut- oder Makulopathologien ausgeschlossen werden konnten [43].

Erste detailliertere Untersuchungen von RPE-Zellen wurden von Feeney-Burns et al. [40, 41] angestellt. Darin wurde von einer steigenden Anzahl der L-Granula, sowie einer Reduktion der Melanosomen mit zunehmendem Alter berichtet. Diese Ergebnisse decken sich nicht vollumfänglich mit den Erkenntnissen der letzten Jahre, die im folgenden Absatz dargestellt werden.

Die erst kürzlich entstandene Analyse der RPE-Zellen mittels Elektronenmikroskopie durch Pollreisz et al. [44] berichtet von einer Reduktion der Melanosomen und einer gleichbleibenden Anzahl an L-Granula mit zunehmendem Alter. Im Vergleich dazu wiesen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Untersuchungen von Feeney-Burns [40] Übereinstimmungen auf. Zur Erklärung dieser Diskrepanzen gibt es diverse Ansätze. Einer der Ansätze basiert sicherlich auf optimierten technischen Möglichkeiten, die eine exakte Lokalisation der Fovea ermöglichen und damit sowohl in der Studie von Pollreisz et al., als auch in der vorliegenden Untersuchung, genormte Ausgangspositionen schaffen. Feeney-Burns hat sich am „posterioren Pol“ (Makula und Austrittspunkt des Nervus opticus) orientiert und damit die Position nur abschätzen können, sodass in diese Studie auch non-foveale Zellen eingeflossen sein könnten. Zudem wurden in der Studie von Feeney-Burns keine ganzen RPE-Zellen untersucht, was zu einer Fehlklassifizierung geführt haben könnte.

Des Weiteren ist bekannt, dass M-Granula in den apikalen Bereichen der RPE-Zellen zahlreich zu finden sind. Man geht von etwa 60 Melanosomen pro RPE-Zelle aus, was bedeuten würde, dass die von uns dargestellte Gesamtzahl der M-Granula pro Zelle um etwa 11% bis 19% unterschätzt wurde. Diese Ergebnisse könnten ihren Ursprung in den

Präparationstechniken der Gewebe haben, die zu einem eventuellen Verlust apikaler Prozesse geführt haben könnten.

Die beobachteten deutlichen Unterschiede in der Granuladichte zwischen RPE-Zellen mit besonders niedrigem und hohem Granulagehalt bestätigen die Annahme einer charakteristischen, photorezeptorspezifischen Geografie der RPE-Zellen.

Dicht gepackte RPE-Zellen mit einer hohen Anzahl an Granula befanden sich vorwiegend in der Perifovea, was wahrscheinlich auf die intensiven Interaktionen zwischen den RPE-Zellen und Stäbchen-Photorezeptoren während des Sehzyklus mit täglicher Ablösung der Discs und anschließender Ablagerung von L-Granula zurückzuführen ist [107]. Im Gegensatz dazu wiesen RPE-Zellen mit geringem Granulagehalt überwiegend ML-Granula auf, was in dieser Arbeit als ein Merkmal fovealer Zellen gewertet wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die Fähigkeit der RPE-Zellen, die intrazelluläre Granulaakkumulation als Teil ihrer Physiologie zu regulieren.

Durch die Kombination der Daten zur AF-Intensität pro RPE-Zelle mit der entsprechenden Anzahl und Verteilung intrazellulärer Granula, hat die vorliegende Arbeit ein neues Präzisionsniveau klinischer hochauflösender Bildgebung geschaffen. Damit leistet sie einen wesentlichen Beitrag zur Interpretation klinischer Bilder. Diese Verknüpfung wird durch die Anwendung neuer in-vivo-Bildgebungstechniken ermöglicht, die durch adaptive optische Modalitäten in der Lage sind einzelne RPE-Zellen zu erfassen [108]. Zudem konnte durch die Einführung der Quantifizierung der FAF-Intensität [59] eine Vergleichbarkeit klinischer Daten mit unseren histologischen Befunden hergestellt werden.

Die aktuellen Studien zur adaptiven Optik [108, 109] schreiben Areale niedriger AF in den En-Face-Projektionsbildern der RPE-Zellen oftmals den Zonen des nicht-AF-Zellkerns zu. Allerdings sollte bei der Interpretation dieser Bilder bedacht werden, dass diese Hypoautofluoreszenzen ebenfalls durch einen hohen Gehalt an optisch dichten Granula (M- oder ML-Granula) hervorgerufen werden könnten.

Der Einsatz hochauflösender Nahinfrarot-AF-Bildgebung wäre ein Ansatz um die Datenlage diesbezüglich zu erweitern. Von dieser Bildgebung sind entscheidende ergänzende Informationen zu erwarten. Grund zu dieser Annahme gibt die Berichterstattung über einen Beitrag des Melanin zu den Nahinfrarot-AF-Signalen [110]. Zudem spielen optisch dichtes Melanin oder Melanosomen auch in anderen bildgebenden Verfahren eine wichtige Rolle. Insbesondere bei Anwendung der OCT sind diese maßgeblich an der Bildgebung beteiligt.

Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten konzentrieren sich einzig auf die AF-Emissionen bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Eine Erweiterung des Beleuchtungsspektrums könnte die Grundlage kommender Arbeiten sein, um AF wie sie Melanosomen zugeschrieben werden, berücksichtigen zu können. Zudem werden unsere Untersuchungen durch die Analyse von drei Retinalokalisationen und einer Anzahl von 10 untersuchten Zellen pro Standort beschränkt. Der mögliche Verlust apikaler Areale durch Präparation gibt Interpretationsspielraum zur Erklärung der vergleichsweise niedrigen Anzahl von reinen Melanosomen. Allerdings liefert ein Variationskoeffizient von ca. 25% eine sehr gute Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit denen anderer RPE-Granula-Studien [44]. Dabei konnten in der vorliegenden Arbeit diverse Vorteile kombiniert zur Anwendung gebracht werden, auf deren Basis eine detaillierte Subklassifikation der Phänotypen der AF-Granula menschlicher RPE-Zellkörper ermöglicht werden konnte.

In kommenden Studien wäre eine Erhöhung der Stichprobengröße denkbar, indem die zeitaufwendige manuelle Granula-Markierung der Z-Stapel durch Zuhilfenahme künstlicher Intelligenz unterstützt und abstrahiert würde. Die Technik der künstlichen Intelligenz findet bereits insbesondere in der digitalen Histologie und Pathologie Anwendung [111, 112].

Als besondere Stärke unserer Arbeit stellt sich die präzise, systematisch durchgeführte Bildgebung zuvor definierter Areale gut erhaltener RPE-Präparate mit geringer postmortaler Zeit dar [43]. Zudem konnte die Verwendung von mehreren Geweben zweier Altersgruppen und die Anwendung hochauflösender Bildgebungstechnik miteinander kombiniert werden, sodass die AF-Bildgebung einzelner AF-Granula innerhalb eines sehr großen Spektrums ermöglicht wurde. Damit geht die Einführung einer detaillierten Subklassifizierung der Phänotypen der AF-Granula in humanen RPE-Zellkörpern einher.

Die Darstellung dieser Arbeit bildet mithin eine wertvolle Datengrundlage und ermöglicht damit weitere Analysen der einzigartigen Biologie des RPE. Die gewonnenen Daten zur charakteristischen intrazellulären Verteilung der Granula, den regionalen Unterschieden und altersbedingten Veränderungen unterstreichen nicht nur die Komplexität der RPE-Granula, sondern sind von wesentlicher Relevanz für die Interpretation klinischer FAF-Bilder und zukünftiger Studiendaten.

5 Zusammenfassung

In den Zellen des humanen retinalen Pigmentepithels (RPE) reichern sich Granula an, die von Bedeutung für die Autofluoreszenz-Bildgebung sind. Das Wissen über die intrazelluläre Aggregation und Verteilung der Granula ist begrenzt. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war daher eine detaillierte Darstellung der im humanen RPE lokalisierten Granula mit Hilfe hochauflösender Mikroskopietechniken. Dabei wurde die Gesamtzahl der Granula pro Zelle, die intrazelluläre Verteilung, sowie deren Veränderungen in Abhängigkeit von der Netzhauttopografie und dem Alter bestimmt.

Hierfür wurden RPE-Zellen aus der Fovea, der Perifovea und der nahen Peripherie von 15 humanen RPE-Präparaten mittels strukturierter Beleuchtungsmikroskopie (SIM) und konfokaler Fluoreszenzmikroskopie bei jungen (≤ 51 Jahre, $n = 8$) und älteren (> 80 Jahre, $n = 7$) Spendern dargestellt. Mithilfe eigens programmierter FIJI-Plugins wurden die Granula computergestützt markiert, anhand morphologischer und autofluoreszierender Eigenschaften klassifiziert und im Hinblick auf die intrazelluläre Verteilung, die Gesamtanzahl pro Zelle und die Granuladichte analysiert.

Insgesamt wurden 193.096 Granula in 450 RPE-Zellkörpern analysiert. Basierend auf deren Autofluoreszenz-Eigenschaften, der Größe und der Zusammensetzung der RPE-Granula konnten durch die Darstellung mittels SIM neun verschiedene Phänotypen unterschieden werden (Lipofuszin, zwei; Melanolipofuszin, fünf; Melanosomen, zwei). Insgesamt zeigte sich, dass Lipofuszin (gering in der Fovea, nimmt aber mit der Exzentrizität und dem Alter zu) und Melanolipofuszin (gleichmäßig an allen drei Lokalisationen vorhanden, keine altersbedingten Veränderungen) die vorherrschenden Granulatypen darstellen. Melanosomen waren aufgrund der suboptimalen Visualisierung der apikalen Prozesse in den RPE-Präparaten unterrepräsentiert.

Auf Basis des in den fovealen Zellkörpern ermittelten niedrigen Lipofuszin- und hohen Melanolipofuszin-Gehaltes, sowie des hohen Anteils von Lipofuszin in der Perifovea, scheint es naheliegend, dass ein Zusammenhang zwischen der Genese der Granula und den darüberliegenden Photorezeptoren (Fovea: nur Zapfen; Perifovea: hohe Stäbchendichte) besteht. Durch die systematische Analyse gibt die vorliegende Arbeit detaillierte Einblicke in die Physiologie der RPE-Zellen und ihrer Granula, die durch die Verbindung der Granula-Menge- und der Autofluoreszenz der Zellen erweitert wurde. Dadurch konnte eine subzelluläre Grundlage für die Interpretation der klinischen Fundus-Autofluoreszenz geschaffen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch, R. and E. Azan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019(6., vollständig überarbeitete Auflage): p. 709-719.
2. Grehn, F., *Augenheilkunde*. 2019(32., erweiterte Auflage).
3. Lüllmann-Rauch, R. and E. Azan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019(6., vollständig überarbeitete Auflage): p. Abb. 26.10b.
4. Obert, E., et al., *Targeting the tight junction protein, zonula occludens-1, with the connexin43 mimetic peptide, alphaCT1, reduces VEGF-dependent RPE pathophysiology*. J Mol Med (Berl), 2017. **95**(5): p. 535-552.
5. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
6. Okada, T., et al., *Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(5): p. 318-24.
7. Young, R.W., *The renewal of photoreceptor cell outer segments*. The Journal of cell biology, 1967. **33**(1): p. 61-72.
8. Young, R.W., *Visual cells and the concept of renewal*. Investigative ophthalmology & visual science, 1976. **15**(9): p. 700-725.
9. Anderson, D.H., S.K. Fisher, and R.H. Steinberg, *Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1978. **17**(2): p. 117-133.
10. Kevany, B.M. and K. Palczewski, *Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors*. Physiology, 2010. **25**(1): p. 8-15.
11. Mazzoni, F., H. Safa, and S.C. Finnemann, *Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture*. Experimental eye research, 2014. **126**: p. 51-60.
12. Kim, I.T. and J.B. Choi, *Melanosomes of retinal pigment epithelium--distribution, shape, and acid phosphatase activity*. Korean Journal of Ophthalmology, 1998. **12**(2): p. 85-91.
13. Sparrow, J.R., D. Hicks, and C. P Hamel, *The retinal pigment epithelium in health and disease*. Current molecular medicine, 2010. **10**(9): p. 802-823.

14. Beatty, S., et al., *Macular pigment and age related macular degeneration*. British Journal of Ophthalmology, 1999. **83**(7): p. 867-877.
15. Beatty, S., et al., *Macular pigment and risk for age-related macular degeneration in subjects from a Northern European population*. Investigative ophthalmology & visual science, 2001. **42**(2): p. 439-446.
16. Bone, R.A., et al., *Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina*. Experimental eye research, 1997. **64**(2): p. 211-218.
17. Handelman, G.J., et al., *Measurement of carotenoids in human and monkey retinas*, in *Methods in enzymology*. 1992, Elsevier. p. 220-230.
18. Landrum, J.T., et al., *Analysis of zeaxanthin distribution within individual human retinas*, in *Methods in enzymology*. 1999, Elsevier. p. 457-467.
19. Curcio, C.A., et al., *Human photoreceptor topography*. Journal of comparative neurology, 1990. **292**(4): p. 497-523.
20. Newman, E. and A. Reichenbach, *The Müller cell: a functional element of the retina*. Trends in neurosciences, 1996. **19**(8): p. 307-312.
21. Mata, N.L., et al., *Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight*. Neuron, 2002. **36**(1): p. 69-80.
22. Hogan, M.J., *Histology of the human eye*. An atlas and textbook, 1971.
23. Boulton, M., *Ageing of the retinal pigment epithelium*. Progress in retinal research, 1991. **11**: p. 125-151.
24. Gonzalez-Fernandez, F., *Interphotoreceptor retinoid-binding protein—an old gene for new eyes*. Vision research, 2003. **43**(28): p. 3021-3036.
25. Gonzalez-Fernandez, F. and D. Ghosh, *Focus on molecules: interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP)*. Experimental eye research, 2008. **2**(86): p. 169-170.
26. Rizzolo, L., *Polarity and the development of the outer blood-retinal barrier*. Histology and histopathology, 1997. **12**(4): p. 1057-1067.
27. Hargrave, P.A., *Rhodopsin Structure, Function, and Topography The Friedenwald Lecture*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2001. **42**(1): p. 3-9.

28. Shichida, Y. and T. Matsuyama, *Evolution of opsins and phototransduction*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2009. **364**(1531): p. 2881-95.
29. Kiser, P.D. and K. Palczewski, *Retinoids and Retinal Diseases*. Annu Rev Vis Sci, 2016. **2**: p. 197-234.
30. Beatty, S., et al., *The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. Survey of ophthalmology, 2000. **45**(2): p. 115-134.
31. O'day, W.T. and R.W. Young, *Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish*. The Journal of cell biology, 1978. **76**(3): p. 593-604.
32. Young, R.W., *The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina*. Investigative ophthalmology & visual science, 1978. **17**(2): p. 105-116.
33. Anderson, R., et al., *Conservation of Docosahexaenoic Acid in the Retina, in Neurobiology of Essential Fatty Acids (Bazan, NG, Murphy, MG, and Toffano, G., eds.) Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol. 318*. 1992, Plenum Press, New York.
34. Bazan, N.G., W.C. Gordon, and E.B. Rodriguez de Turco, *Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process*. Neurobiology of Essential Fatty Acids, 1992: p. 295-306.
35. Mayerson, P.L. and M.O. Hall, *Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro*. The Journal of cell biology, 1986. **103**(1): p. 299-308.
36. Handelman, G.J. and E.A. Dratz, *The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant-induced damage*. Advances in Free Radical Biology & Medicine, 1986. **2**(1): p. 1-89.
37. Handelman, G.J., et al., *Carotenoids in the human macula and whole retina*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1988. **29**(6): p. 850-855.
38. Miceli, M.V., M.R. Liles, and D.A. Newsome, *Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis*. Experimental cell research, 1994. **214**(1): p. 242-249.
39. Alm, A. and A. Bill, *The Oxygen Supply to the Retina, II. Effects of High Intraocular Pressure and of Increased Arterial Carbon Dioxide Tension on Uveal and Retinal*

- Blood Flow in Cats: A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues.* Acta physiologica Scandinavica, 1972. **84**(3): p. 306-319.
40. Feeney-Burns, L., E.S. Hilderbrand, and S. Eldridge, *Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(2): p. 195-200.
41. Feeney, L., *Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies.* Investigative ophthalmology & visual science, 1978. **17**(7): p. 583-600.
42. Starnes, A.C., et al., *Multi-nucleate retinal pigment epithelium cells of the human macula exhibit a characteristic and highly specific distribution.* Visual neuroscience, 2016. **33**.
43. Ach, T., et al., *Quantitative autofluorescence and cell density maps of the human retinal pigment epithelium.* Investigative ophthalmology & visual science, 2014. **55**(8): p. 4832-4841.
44. Pollreisz, A., et al., *Visualizing melanosomes, lipofuscin, and melanolipofuscin in human retinal pigment epithelium using serial block face scanning electron microscopy.* Experimental eye research, 2018. **166**: p. 131-139.
45. Pollreisz, A., et al., *Visualizing retinal pigment epithelium (RPE) melanosomes, lipofuscin, melanolipofuscin (M, L, ML) in human eyes of different ages using 3-dimensional serial block face scanning electron microscopy (3D SBFSEM).* Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2016. **57**(12).
46. Bermond, K., et al., *Autofluorescent Granules of the Human Retinal Pigment Epithelium: Phenotypes, Intracellular Distribution, and Age-Related Topography.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020. **61**(5): p. 35.
47. Ach, T. and K. Bermond, *Autofluorescence of the Human Retinal Pigment Epithelium in Normal Aging and in Age-Related Macular Degeneration: Histology and Clinical Correlation.* Klin Monbl Augenheilkd, 2019. **236**(5): p. 672-681.
48. Boulton, M., *The role of melanin in the RPE.* The retinal pigment epithelium. Oxford University Press, Oxford, 1998: p. 68-85.
49. Feeney-Burns, L., *The pigments of the retinal pigment epithelium.* Curr Top Eye Res, 1980. **2**: p. 119-78.

50. Ach, T., et al., *Autofluorescence imaging of human RPE cell granules using structured illumination microscopy*. Br J Ophthalmol, 2012. **96**(8): p. 1141-4.
51. Ng, K.-P., et al., *Retinal pigment epithelium lipofuscin proteomics*. Molecular & Cellular Proteomics, 2008. **7**(7): p. 1397-1405.
52. Boyer, N.P., et al., *Lipofuscin and N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) accumulate in retinal pigment epithelium in absence of light exposure: their origin is 11-cis-retinal*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(26): p. 22276-22286.
53. Sparrow, J.R. and M. Boulton, *RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology*. Experimental eye research, 2005. **80**(5): p. 595-606.
54. Ach, T., et al., *Lipofuscin redistribution and loss accompanied by cytoskeletal stress in retinal pigment epithelium of eyes with age-related macular degeneration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2015. **56**(5): p. 3242-3252.
55. Gliem, M., et al., *Quantitative fundus autofluorescence in early and intermediate age-related macular degeneration*. JAMA ophthalmology, 2016. **134**(7): p. 817-824.
56. Sparrow, J.R., et al., *Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids*. Journal of lipid research, 2010. **51**(2): p. 247-261.
57. Lichtman, J.W. and J.-A. Conchello, *Fluorescence microscopy*. Nature methods, 2005. **2**(12): p. 910-919.
58. Delori, F.C., et al., *In vivo fluorescence of the ocular fundus exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics*. Investigative ophthalmology & visual science, 1995. **36**(3): p. 718-729.
59. Delori, F., et al., *Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(13): p. 9379-90.
60. Keilhauer, C.N. and F.C. Delori, *Near-infrared autofluorescence imaging of the fundus: visualization of ocular melanin*. Investigative ophthalmology & visual science, 2006. **47**(8): p. 3556-3564.
61. Bonilha, V.L., *Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium*. Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ), 2008. **2**(2): p. 413.

62. Rozanowska, M., et al., *Blue light-induced reactivity of retinal age pigment: IN vitro generation OF oxygen-reactive species (*)*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(32): p. 18825-18830.
63. Young, R.W., *Pathophysiology of age-related macular degeneration*. Survey of ophthalmology, 1987. **31**(5): p. 291-306.
64. Klein, R., et al., *The relationship of age-related maculopathy, cataract, and glaucoma to visual acuity*. Investigative ophthalmology & visual science, 1995. **36**(1): p. 182-191.
65. Reimer, L., *Transmission electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. Vol. 36. 2013: Springer.
66. Denk, W., H. Horstmann, and K.M. Harris, *Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure*. PLoS biology, 2004. **2**(11): p. e329.
67. Sanderson, M.J., et al., *Fluorescence microscopy*. Cold Spring Harbor Protocols, 2014. **2014**(10): p. pdb. top071795.
68. Pawley, J., *Handbook of biological confocal microscopy*. Vol. 236. 2006: Springer Science & Business Media.
69. Abbe, E., *Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung*. Archiv für mikroskopische Anatomie, 1873. **9**(1): p. 413-468.
70. Stelzer, E.H., *The intermediate optical system of laser-scanning confocal microscopes*, in *Handbook of biological confocal microscopy*. 2006, Springer. p. 207-220.
71. Claxton, N.S., T.J. Fellers, and M.W. Davidson, *Laser scanning confocal microscopy*. Encyclopedia of Medical Devices and Instrumentation, 2006. **21**: p. 1-37.
72. Gustafsson, M.G., *Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy*. Journal of microscopy, 2000. **198**(2): p. 82-87.
73. Gustafsson, M.G., *Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(37): p. 13081-13086.

74. Yung, M., M.A. Klufas, and D. Sarraf, *Clinical applications of fundus autofluorescence in retinal disease*. International Journal of Retina and Vitreous, 2016. **2**(1): p. 12.
75. Schmitz-Valckenberg, S., et al., *Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives*. Retina, 2008. **28**(3): p. 385-409.
76. Delori, F.C., *Spectrophotometer for noninvasive measurement of intrinsic fluorescence and reflectance of the ocular fundus*. Appl Opt, 1994. **33**(31): p. 7439-52.
77. Webb, R. and G. Hughes, *Pomerantzeff O. Flying spot TV ophthalmoscope*. Applied Optics, 1980. **19**: p. 2991-2997.
78. Webb, R.H. and G.W. Hughes, *Scanning laser ophthalmoscope*. IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 1981(7): p. 488-492.
79. Webb, R.H., G.W. Hughes, and F.C. Delori, *Confocal scanning laser ophthalmoscope*. Applied optics, 1987. **26**(8): p. 1492-1499.
80. Gramatikov, B.I., *Modern technologies for retinal scanning and imaging: an introduction for the biomedical engineer*. Biomedical engineering online, 2014. **13**(1): p. 1-35.
81. von Ruckmann, A., F.W. Fitzke, and A.C. Bird, *Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope*. Br J Ophthalmol, 1995. **79**(5): p. 407-12.
82. Greenberg, J.P., et al., *Quantitative fundus autofluorescence in healthy eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(8): p. 5684-93.
83. Huang, D., et al., *Optical coherence tomography*. Science, 1991. **254**(5035): p. 1178-81.
84. Quinn, N., et al., *The clinical relevance of visualising the peripheral retina*. Prog Retin Eye Res, 2019. **68**: p. 83-109.
85. Polyak, S.L., *The retina; the anatomy and the histology of the retina in man, ape, and monkey, including the consideration of visual functions, the history of physiological optics, and the histological laboratory technique*. Chicago, Univ. of Chicago Press., 1941.

86. Curcio, C.A., N.E. Medeiros, and C.L. Millican, *The Alabama Age-Related Macular Degeneration Grading System for donor eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(7): p. 1085-96.
87. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. , *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. 2012: p. 676–682.
88. Bermond, K., et al., *Characteristics of normal human retinal pigment epithelium cells with extremes of autofluorescence or intracellular granule count*. Ann Eye Sci, 2021. **6**.
89. Best, G., et al., *Structured illumination microscopy of autofluorescent aggregations in human tissue*. Micron, 2011. **42**(4): p. 330-335.
90. Cuervo, A.M. and J.F. Dice, *When lysosomes get old*☆. Experimental gerontology, 2000. **35**(2): p. 119-131.
91. Sparrow, J.R., *Lipofuscin of the retinal pigment epithelium*. Atlas of fundus autofluorescence imaging. Springer, Heidelberg, 2007: p. 1-16.
92. Sparrow, J.R., et al., *The bisretinoids of retinal pigment epithelium*. Progress in retinal and eye research, 2012. **31**(2): p. 121-135.
93. Gambriel, J.A., et al., *Quantifying retinal pigment epithelium dysmorphia and loss of histologic autofluorescence in age-related macular degeneration*. Investigative ophthalmology & visual science, 2019. **60**(7): p. 2481-2493.
94. Hughes, A., *The topography of vision in mammals of contrasting life style: comparative optics and retinal organisation*, in *The visual system in vertebrates*. 1977, Springer. p. 613-756.
95. Wang, J.-S. and V.J. Kefalov, *The cone-specific visual cycle*. Progress in retinal and eye research, 2011. **30**(2): p. 115-128.
96. Weiter, J., et al., *Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes*. Investigative ophthalmology & visual science, 1986. **27**(2): p. 145-152.
97. Wing, G.L., G.C. Blanchard, and J.J. Weiter, *The topography and age relationship of lipofuscin concentration in the retinal pigment epithelium*. Investigative ophthalmology & visual science, 1978. **17**(7): p. 601-607.

98. Streeten, B.W., *Development of the human retinal pigment epithelium and the posterior segment*. Archives of ophthalmology, 1969. **81**(3): p. 383-394.
99. Hendrickson, A.E. and C. Yuodelis, *The morphological development of the human fovea*. Ophthalmology, 1984. **91**(6): p. 603-612.
100. Hendrickson, A., et al., *Histologic development of the human fovea from midgestation to maturity*. American journal of ophthalmology, 2012. **154**(5): p. 767-778. e2.
101. Quazi, F. and R.S. Molday, *ATP-binding cassette transporter ABCA4 and chemical isomerization protect photoreceptor cells from the toxic accumulation of excess 11-cis-retinal*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(13): p. 5024-5029.
102. Dontsov, A., N. Sakina, and M. Ostrovsky, *Loss of melanin by eye retinal pigment epithelium cells is associated with its oxidative destruction in melanolipofuscin granules*. Biochemistry (Moscow), 2017. **82**(8): p. 916-924.
103. Biesemeier, A., U. Schraermeyer, and O. Eibl, *Chemical composition of melanosomes, lipofuscin and melanolipofuscin granules of human RPE tissues*. Experimental eye research, 2011. **93**(1): p. 29-39.
104. Cortese, K., et al., *The ocular albinism type 1 (OA1) gene controls melanosome maturation and size*. Investigative ophthalmology & visual science, 2005. **46**(12): p. 4358-4364.
105. Wilk, M.A., et al., *Relationship between foveal cone specialization and pit morphology in albinism*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(7): p. 4186-98.
106. Schütze, C., et al., *Retinal pigment epithelium findings in patients with albinism using wide-field polarization-sensitive optical coherence tomography*. Retina, 2014. **34**(11): p. 2208-2217.
107. Crouch, R.K., et al., *A2E and Lipofuscin*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2015. **134**: p. 449-63.
108. Granger, C.E., et al., *Human retinal pigment epithelium: in vivo cell morphometry, multispectral autofluorescence, and relationship to cone mosaic*. Investigative ophthalmology & visual science, 2018. **59**(15): p. 5705-5716.

109. Tam, J., et al., *In vivo imaging of the human retinal pigment epithelial mosaic using adaptive optics enhanced indocyanine green ophthalmoscopy*. Investigative ophthalmology & visual science, 2016. **57**(10): p. 4376-4384.
110. Lapierre-Landry, M., J. Carroll, and M.C. Skala, *Imaging retinal melanin: a review of current technologies*. Journal of biological engineering, 2018. **12**(1): p. 1-13.
111. McCarthy, J., M. Minsky, and N. Rochester, *Artificial intelligence (Research Laboratory of Electronics (RLE) at the Massachusetts Institute of Technology*. 1959, MIT.
112. Salto-Tellez, M., P. Maxwell, and P. Hamilton, *Artificial intelligence-the third revolution in pathology*. Histopathology, 2019. **74**(3): p. 372-376.

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histologische Darstellung der Retina	3
Abbildung 2: Funktionen des RPE	8
Abbildung 3: Autofluoreszierende Granula in RPE-Zellen	12
Abbildung 4: Ausschnitte einer fovealen- und perifovealen RPE-Zelle	13
Abbildung 5: Intrazelluläre Verteilung der Granula einer RPE-Zelle	14
Abbildung 6: Fundusautofluoreszenz bei 488 nm und 787 nm	19
Abbildung 7: Auswahl der RPE-Zellen und Klassifizierung der Granula mit Hilfe des benutzerdefinierten FIJI-Plugins	26
Abbildung 8: SIM-Schnittbild einer RPE-Zelle	27
Abbildung 9: SIM- und LSM-Bildgebung von RPE-Zellen	28
Abbildung 10: Subklassifikation der Granula	31
Abbildung 11: Anzahl der Granula pro Zelle	33
Abbildung 12: Darstellung der prozentualen Verteilung der Granula in der Fovea, Perifovea und der nahen Peripherie	36
Abbildung 13: Intrazelluläre Granulaverteilung aus zwei Ebenen	37
Abbildung 14: Intrazelluläre Granulaverteilung	39
Abbildung 15: Zellfläche und Anzahl der Granula pro Zelle	41
Abbildung 16: RPE-Zellen mit besonders geringem bzw. hohem Granulagehalt	42
Abbildung 17: RPE-Zellen mit besonders niedriger bzw. hoher AF- Intensität	44

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anzahl der Granula pro Zelle oder Projektionsfläche in der Fovea, Perifovea und nahen Peripherie.	34
Tabelle 2: Merkmale von RPE-Zellen mit extremen Granulawerten und Autofluoreszenz-Intensitäten.	45

III. Abkürzungsverzeichnis

AF	Autofluoreszenz
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
A2E	N-Retinylden-N-Retinylethanolamin
BM	Bruch-Membran
CCD	charge-coupled device
cSLO	konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie
FAF	Fundus-Autofluoreszenz
IPM	Interphotorezeptormatrix
IRBP	Interphotoreceptor Binding Protein
L	Lipofuszin
M	Melanosomen
ML	Melanolipofuszin
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinase
nm	Nanometer
OCT	Optische Kohärenztomographie
PEDF	pigment epithelium-derived growth factor
qAF	quantitative Autofluoreszenz des Fundus
RPE	retinales Pigmentepithel
SBFSEM	Serial block-face scanning electron microscopy
LSM	konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
VEGF	vascular epithelium growth factor
µm	Mikrometer

IV. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Privatdozenten Dr. Thomas Ach für die gute Betreuung der Arbeit, die ständige Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen. Sein enormes Engagement und seine Leidenschaft gegenüber der Augenheilkunde haben mich dazu bewegt, bei Ihm als meinen Doktorvater promovieren zu wollen.

Zudem bedanke ich mich bei meinen Betreuern Herrn Professor Dr. Jost Hillenkamp und Herrn Privatdozenten Dr. Daniel Hellmann für Ihre Unterstützung am Promotionsprojekt, die eine Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit war.

Einen besonderen Dank für die gute Zusammenarbeit möchte ich an Herrn Dr. Kenneth Sloan aus dem Department of Computer and Information Sciences an der University of Alabama in Birmingham richten, ohne dessen Entwicklung des Analyseplugins die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Katharina Bermond und Frau Dr. Ioana Tarau, die mit Ihrer großartigen Vor- und Zusammenarbeit maßgeblich an der Umsetzung dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich möchte mich ausdrücklich bei der Dr. Werner Jackstädt-Stiftung für die Förderung und Unterstützung dieses Forschungsprojekts bedanken.

Schließlich gehen ein besonderer Dank und die Widmung dieser Arbeit an meine Familie, insbesondere an meine Eltern, die mir diesen Werdegang ermöglicht haben und die mich auf meinem Weg jederzeit geduldig mit Rat, Anregungen und lieben Worten begleitet haben.

V. Lebenslauf

VI. Publikationen

1. Characteristics of normal human retinal pigment epithelium cells with extremes of autofluorescence or intracellular granule count.

Bermond K, Berlin A, Tarau IS, **Wobbe C**, Heintzmann R, Curcio CA, Sloan KR, Ach T. Ann Eye Sci. 2021 Mar;6:3. doi: 10.21037/aes-2021-01. Epub 2021 Mar 15. PMID: 34291192

2. Autofluorescent Granules of the Human Retinal Pigment Epithelium: Phenotypes, Intracellular Distribution, and Age-Related Topography.

Bermond K, **Wobbe C**, Tarau IS, Heintzmann R, Hillenkamp J, Curcio CA, Sloan KR, Ach T. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2020 May 11;61(5):35. doi: 10.1167/iovs.61.5.35. PMID: 32433758