

Untersuchungen epigenetischer Veränderungen während der fetalen Entwicklung des Auges

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Michael Thorsten Jost

aus Dormagen

2026

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Martina C. Herwig-Carl
2. Gutachter: Prof. Dr. Christian Vokuhl

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2026

Aus der Augenklinik

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	6
1.	Einleitung	8
1.1	Allgemeine pränatale Entwicklung des Auges	8
1.2	Pränatale Entwicklung der Hornhaut	10
1.3	Pränatale Entwicklung des Kammerwinkels und der angrenzenden Strukturen	11
1.4	Pränatale Entwicklung der Chorioidea	13
1.5	Pränatale Entwicklung der Retina	14
1.6	Epigenetik	17
1.6.1	Grundlagen der Epigenetik	17
1.6.2	Epigenetische Regulationsmechanismen	19
1.6.2.1	DNA-Methylierung	19
1.6.2.2	DNA-Methylierung während der pränatalen Entwicklung	21
1.6.2.3	Hydroxymethylierung von Cytosinbasen	22
1.6.2.4	Modifikation von Histonproteinen	23
1.7	Fragestellung	25
2.	Material und Methoden	27
2.1	Gewebe	27
2.2	Antikörper	28
2.3	Zuschnitt der fetalen Augen	29
2.4	Immunhistochemie	29
2.4.1	Vorbereitung des Gewebes	30
2.4.2	Epitopdemaskierung	30
2.4.3	Proteinblockierung	31
2.4.4	Primärantikörper	31
2.4.5	Inhibition endogener Peroxidase-Aktivität	32
2.4.6	Labelled Streptavidin-Biotin-Methode	32
2.4.7	Polymerkonjugat-Methode	33
2.4.8	Farbreaktion, Gegenfärbung und Eindecken	34

2.5	Semiquantitative Auswertung der Farbreaktion	34
2.6	Morphologische Auswertung der retinalen Zellarchitektur	36
2.7	Statistische Auswertung	36
2.8	Geräte und Reagenzien	37
3.	Ergebnisse	39
3.1	Deskriptive Statistik	39
3.2	Korrelation Alter und Farbscore	39
3.2.1	Korrelation Alter und Farbscore in der Kornea	41
3.2.2	Korrelation Alter und Farbscore im Kammerwinkel	42
3.2.3	Korrelation Alter und Farbscore in der Aderhaut	44
3.2.4	Korrelation Alter und Farbscore in der zentralen Retina	46
3.2.5	Korrelation Alter und Farbscore in der peripheren Retina	47
3.3	Korrelation zwischen den epigenetischen Modifikationen	48
3.4	Korrelation zwischen zentraler und peripherer Retina	51
3.5	Einfluss des Geschlechts auf den Farbscore	52
3.6	Vergleich mit der adulten Retina	53
3.7	Morphologische Auswertung	53
3.7.1	Woche 11 und 12	54
3.7.2	Woche 13 und 14	55
3.7.3	Woche 15 und 16	57
3.7.4	Woche 17 und 18	61
3.7.5	Woche 19 und 20	64
3.7.6	Woche 21 und 22	67
3.7.7	Woche 23 und 24	70
3.7.8	Woche 26	73
3.7.9	Woche 32	76
3.7.10	Woche 34	78
3.7.11	Woche 38	81
4.	Diskussion	85
4.1	Zelltypspezifische Epigenetik der retinalen Zellen	85
4.1.1	Gemeinsamkeiten der Ganglienzellen und amakrinen Zellen	87

4.1.2	Gemeinsamkeiten Müllerzellen mit Ganglienzellen und Amakrinzellen	88
4.2	Zusammenhang zwischen Alter und globalem Epigenom	88
4.3	Zusammenhang zellulärer Differenzierungsgrad und Epigenom	90
4.4	Bedeutung epigenetischer Faktoren während der Fetalperiode	92
4.4.1	Rolle von Histonmodifikationen in der retinalen Entwicklung	92
4.4.2	Rolle der DNA-Methylierung in der retinalen Entwicklung	93
4.4.3	Rolle der DNA-Hydroxymethylierung in der retinalen Entwicklung	94
4.4.4	Rolle der Epigenetik in der Kornea	95
4.4.5	Rolle der Epigenetik im Kammerwinkel	95
4.4.6	Rolle der Epigenetik in der Aderhaut	96
4.5	Interaktion zwischen den epigenetischen Mechanismen	97
4.6	Geschlechtsabhängigkeit des Epigenoms	98
5.	Zusammenfassung	100
6.	Abbildungsverzeichnis	101
7.	Tabellenverzeichnis	107
8.	Literaturverzeichnis	108
9.	Erklärung zum Eigenanteil	127
10.	Veröffentlichung	129
11.	Danksagung	130

Abkürzungsverzeichnis

5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Anti-5hMeC	Anti-5-hydroxymethylcytosin
Anti-5MeC	Anti-5-methylcytosin
Anti-H3Ac	Anti-acetyl-Histon H3
Anti-H4Ac	Anti-acetyl-Histon H4
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIPseq	Chromatin-Immunoprecipitation-DNA-Sequencing
CpG	5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'
DNMT	DNA-Methyltransferase
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fab	Fragment antigen binding
GCL	Ganglion cell layer, Ganglienzellschicht
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase
IgG	Immunglobulin G
INL	Inner nuclear layer, innere Körnerschicht

Lhx2	LIM homeobox protein 2
ONL	Outer nuclear layer, äußere Körnerschicht
Pax6	Paired Box Protein 6
PTM	Posttranslationale Modifikationen
RPE	Retinales Pigmentepithel
Rx1	Retinales Homöobox -Gen 1
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
Six	Sine Oculis-Related Homeobox
SSM	Schwangerschaftsmonat
SSW	Schwangerschaftswoche
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TET	Ten-Eleven Translocation

1. Einleitung

1.1 Allgemeine pränatale Entwicklung des Auges

Das Auge entwickelt sich aus verschiedenen embryonalen Anteilen, die überwiegend dem ektodermalen Keimblatt entstammen. Aus dem Neuroektoderm des Vorderhirns entstehen die Neuroretina, das retinale Pigmentepithel (RPE) und der Nervus opticus sowie die Epithelien von Iris und Ziliarkörper. Die Linse und das Korneaepithel differenzieren sich aus dem Oberflächenektoderm (Dhouailly et al., 2014). Das Kopfmesenchym, das von kranialen Neuralleistenzellen gebildet wird, bringt Stroma und Endothel der Kornea, den Glaskörper, die Chorioidea und Sklera sowie das Stroma von Iris und Ziliarkörper hervor; die extraokulären Muskeln und das Endothel der okulären Blutgefäße entstammen dem mesodermalen Keimblatt (Abb. 1) (Augustin, 2001; Balazs et al., 1980; Barishak, 2001; Tamm und Ohlmann, 2012).

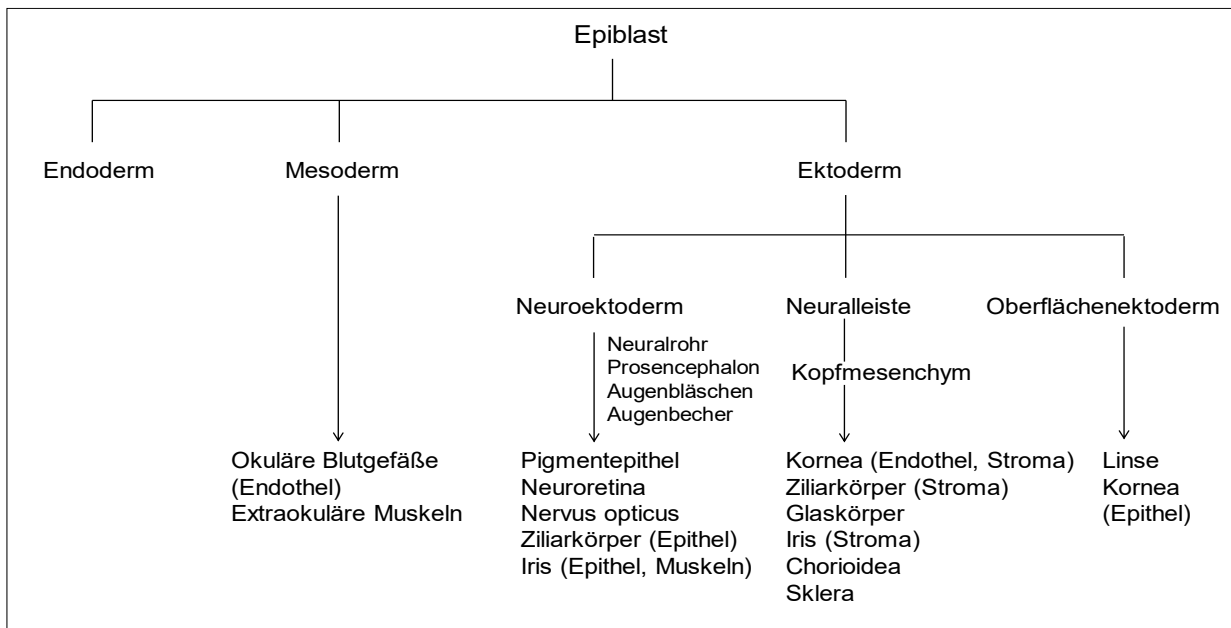


Abb. 1: Embryologischer Ursprung okulärer Gewebestrukturen

Die Organogenese des Auges beginnt in der 3. Schwangerschaftswoche (SSW) mit der Determination des Augenfeldes auf der Neuralplatte durch die Wirkung von Transkriptionsfaktoren wie Rx1, Six3, Six6, Lhx2 und insbesondere Pax6, einem Schlüsselgen der Augenentwicklung, das in allen okulären Strukturen exprimiert wird (Zuber et al., 2003).

Die Vertiefung der Neuralplatte während der Neurulation führt zur Neuralrinne, deren Ränder die Neuralfalten bilden, wodurch das Augengebiet unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Sonic Hedgehog in zwei Abschnitte geteilt wird (Amato et al., 2004). Am 22. Entwicklungstag bilden sich auf der Innenseite der kranialen Neuralfalten die Sulci optici aus, das früheste sichtbare Zeichen der Augenentwicklung (O'Rahilly, 1983). Nach dem Verschluss des anterioren Neuroporus am 24. Entwicklungstag stülpt sich das Epithel im Bereich der Sulci optici in das umliegende Mesenchym ein und es kommt zur lateralen Evagination der Wand des sich schnell entwickelnden Prosencephalons im Bereich des späteren Diencephalons, wodurch die Augenbläschen entstehen (Sadler und Langman, 2014). Diese wachsen weiter vor in Richtung Oberflächenektoderm und bilden dabei eine stielförmige Struktur, den Augienstiel, dessen Lumen weiterhin Kontakt zum Vorderhirn hat (Hinrichsen et al., 2014). Gleichzeitig dehnt sich das distale Ende des Augenbläschens stark aus (Hinrichsen et al., 2014). Sobald es mit dem Oberflächenektoderm in Kontakt kommt, wird die Bildung der Linsenplakode induziert (Graumann und Sasse, 2014). Diese sackt anschließend in Richtung Augenbläschen ein und bildet die Linsenrinne, aus der sich in der 5. SSW das Linsenbläschen entwickelt (Graumann und Sasse, 2014). Durch seinen Kontaktverlust zum Oberflächenektoderm induziert es dort die Hornhautentwicklung (Tamm und Ohlmann, 2012). In der 6. SSW beginnt mit der Ausbildung von Linsenfasern die Differenzierung des Linsenbläschens zur Linse (Barishak, 2001).

Parallel zur Formierung des Linsenbläschens kommt es durch Einstülpung der distalen Bereiche des Augenbläschens zur Ausbildung des Augenbechers, der das Linsenbläschen umschließt (Hinrichsen et al., 2014). Das äußere und innere Blatt des Augenbechers sind durch das Lumen des Sehventrikels getrennt (Tamm und Ohlmann, 2012). Aus dem äußeren Blatt entwickelt sich das RPE, aus dem inneren Blatt geht die Neuroretina hervor; der Sehventrikel wird während der weiteren Entwicklung obliterieren (Tamm und Ohlmann, 2012). Zeitgleich mit der Bildung des Augenbechers formiert sich durch Invagination von mesenchymalem Gewebe an der Ventralseite des Augenbechers und des Augienstiels, in diesem Stadium Augenbecherstiel genannt, die Augenbecherspalte (Hinrichsen et al., 2014). Durch sie treten Arteria und Vena hyaloidea ein, die den Augenbecher, die Linse (Linsenbläschen) und den sich entwickelnden Glaskörper versorgen (Sadler und Langman, 2014). Durch den Verschluss der Augenbecherspalte in der 7.

SSW kommt es zum Einschluss der sich im Glaskörperraum befindlichen Gefäße (Barishak, 2001). Der Augenbecherstiel entwickelt sich in der 8. bis 9. SSW durch die rasche Zunahme von Nervenfasern zum Nervus opticus (Barishak, 2001). Im Bereich des Nervus opticus persistieren Arteria und Vena hyaloidea als Arteria und Vena centralis retinae, die distalen Abschnitte werden während der weiteren Entwicklung obliterieren (Lüllmann-Rauch und Asan, 2015). Aus dem Mesenchym, das den Augenbecher umgibt, gehen Sklera und Chorioidea hervor (Graumann und Sasse, 2014).

1.2 Pränatale Entwicklung der Hornhaut

Die transparente Hornhaut (Kornea, Abb. 2) bildet zusammen mit der Lederhaut (Sklera) die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) und ist mit einer Brechkraft von 43 Dioptrien die bedeutendste lichtbrechende Struktur des dioptrischen Apparates (Sachsenweger et al., 2002). Die Differenzierung der Kornea setzt in der 5. SSW nach der Trennung des Linsenbläschens vom Oberflächenektoderm ein (Barishak, 2001). Das Linsenbläschen induziert im sich darüber wieder schließenden Oberflächenektoderm die Anlage des Epithels der zukünftigen Kornea (Tamm und Ohlmann, 2012). Einwandernde mesenchymale Zellen aus der Neuralleiste ordnen sich im Bereich zwischen dem vorderen Linsenbläschenepithel und dem Hornhautepithel an und beginnen das Hornhautstroma auszubilden (Eghrari et al., 2015). Weitere mesenchymale Zellen wandern ein, verdichten sich und bilden in der Zone, die dem vorderen Linsenbläschenepithel benachbart ist, eine Zellschicht aus, die sich zum Hornhautendothel differenziert (Tamm und Ohlmann, 2012). Danach kommt es zur Trennung von Linsenepithel und Hornhautanlage, wodurch sich eine primäre vordere Augenkammer formiert. In der 8. SSW beginnt die vom kornealen Endothel ausgehende Differenzierung der Descemet-Membran (Verdijk und Herwig-Carl, 2020). In den folgenden SSW reifen die kornealen Schichten weiter aus. Als letzte Schicht der Kornea differenziert sich im 5. Schwangerschaftsmonat (SSM) die Bowman-Schicht, die aus oberflächlich gelegenen mesenchymalen Strukturen des Stromas hervorgeht (Barishak, 2001; Verdijk und Herwig-Carl, 2020).

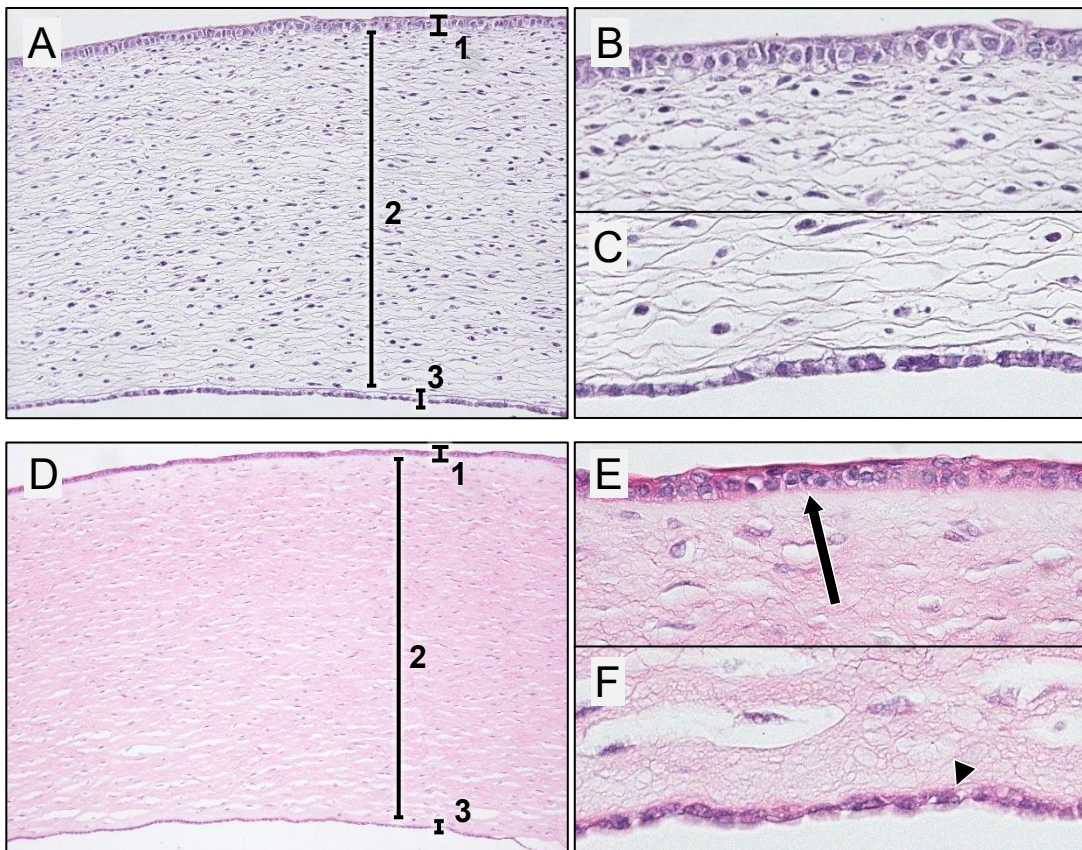


Abb. 2: Beispielhafte Darstellung der Kornea in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (13. SSW (A-C), 23 SSW. (D-F), HE-Färbung). 1: Hornhautepithel. 2: Hornhautstroma. 3: Descemet-Membran und Hornhautendothel. Pfeil: Bowman-Schicht. Pfeilspitze: Descemet-Membran. A: 200fache Vergrößerung. D: 100fache Vergrößerung. B, C, E, F: 400fache Vergrößerung

1.3 Pränatale Entwicklung des Kammerwinkels und der angrenzenden Strukturen

Der Kammerwinkel (Angulus iridocornealis) befindet sich in der Peripherie der von Kornea und Iris gebildeten vorderen Augenkammer im Bereich des Limbus corneae (Abb. 3). Er trägt mit der Drainage des in den Ziliarkörperfortsätzen gebildeten Kammerwassers zur Aufrechterhaltung des intraokulären Drucks bei.

Der Kammerwinkel bildet sich während der embryonalen und fetalen Entwicklung in Abhängigkeit von den sich differenzierenden Strukturen von Kornea, Sklera, Ziliarkörper und Iris aus mesenchymalen Zellen, die der kranialen Neuralleiste entstammen. Die Morphogenese des Kammerwinkels beginnt in der 6./7. SSW durch Einwanderung mesenchymaler Zellen in die primäre vordere Augenkammer, die sich zwischen der sich entwickelnden Kornea und dem losgelösten Linsenbläschen ausgebildet hat (Tamm und Ohlmann, 2012; Verdijk und Herwig-Carl, 2020). Die Kondensation von mesenchymalen Zellen in der 8.

SSW führt zur Entwicklung der Sklera (Barishak, 2001). Gleichzeitig wachsen die distalen Bereiche der Augenbecherränder und bilden ab der 9. SSW die Anfänge des Ziliarkörpergewebes aus. Während der folgenden Wochen differenziert sich der Ziliarkörper weiter und bildet im 4. SSM die Ziliarkörperfortsätze, die das Kammerwasser sezernieren (Augustin, 2001). Anfang des 4. SSM setzt die Ausbildung der Iris ein, die zur Formierung der vorderen und hinteren Augenkammer führt (Tamm und Ohlmann, 2012). Der Schlemm-Kanal ist ab der 16. SSW sichtbar (Verdijk und Herwig-Carl, 2020). In der vorderen Augenkammer reichern sich in den Kammerwinkel einwandernde mesenchymale Zellen weiter an und bilden die Grundlage für das zukünftige Trabekelmaschenwerk (Hinrichsen et al., 2014). Ende des 4. SSM bis Anfang des 5. SSM beginnen sich die Spalten der Fontana-Räume auszubilden und das Gefäßsystem des Schlemm-Kanals in der Sklera formiert sich (Hinrichsen et al., 2014). Die mesenchymalen Zellen des Trabekelwerkes differenzieren sich weiter zu Trabekeln, die ein aus Bindegewebe bestehendes Maschenwerk ausbilden (Tamm und Ohlmann, 2012).

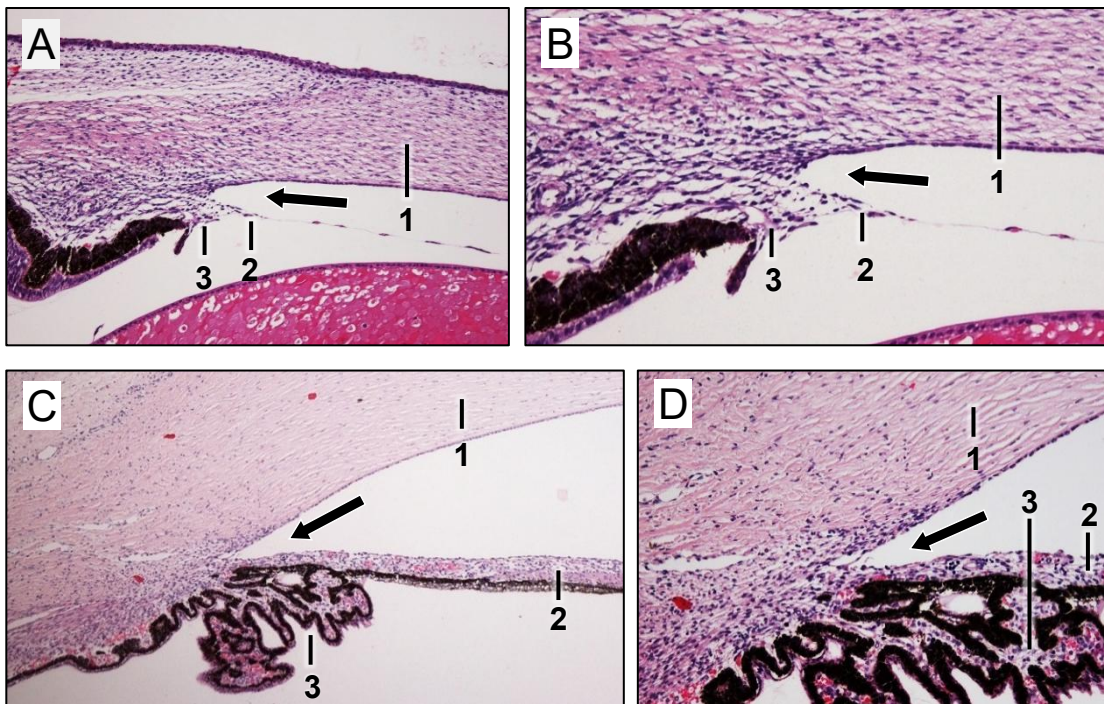


Abb. 3: Beispielhafte Darstellung des Kammerwinkels während der fetalen Entwicklung im Alter von 14 SSW (A, B) bzw. 19 SSW (C, D), HE-Färbung. 1: Kornea. 2: Irisstroma. 3: Ziliarkörper. Pfeil: Kammerwinkel. A, C: 40fache Vergrößerung. B, D: 100fache Vergrößerung. Modifiziert nach (Verdijk und Herwig-Carl, 2020)

1.4 Pränatale Entwicklung der Chorioidea

Die gefäßreiche Aderhaut (Chorioidea, Abb. 4) befindet sich zwischen Retina und Sklera und bildet mit Iris und Ziliarkörper die mittlere Augenhaut (Tunica vasculosa bulbi). Die arterielle Blutversorgung der choroidalen Gefäße geschieht vor allem über die Arteria ciliaris posteriora brevis aus der Arteria ophthalmica. Das venöse Blut wird über die Vortexvenen (Venae vorticosae) in die Vena ophthalmica abgeleitet.

Sobald in der 6./7. SSW Zellen der inneren Schicht des Mesenchyms, das den Augenbecher umgibt, mit dem sich entwickelnden RPE in Kontakt kommen, beginnen sie mit der Ausbildung einer primären Choriokapillaris (Nickla und Wallman, 2010; Sadler und Langman, 2014). Zeitgleich sind Erythroblasten nachweisbar und eine rudimentäre Bruchmembran erkennbar (Barishak, 2001). Bis zur 9. SSW hat sich aus Inseln von Vorläuferzellen eine aus Kapillaren bestehende vaskularisierte Schicht entwickelt (Baba et al., 2009). Zwischen dem 3. und 5. SSM entwickelt sich mit der Ausbildung größerer Blutgefäße die Lamina vasculosa (Barishak, 2001). Mit Beginn des 5. SSM hat sich die Bruchmembran entwickelt (Barishak, 2001). Ende des 5. SSM sind alle Schichten der Aderhaut differenziert (Barishak, 2001). Die Pigmentierung der Chorioidea beginnt mit dem Auftreten von Melanoblasten zunächst in der Lamina suprachoroidea und setzt sich im weiteren Entwicklungsverlauf in den inneren Schichten fort (Barishak, 2001).

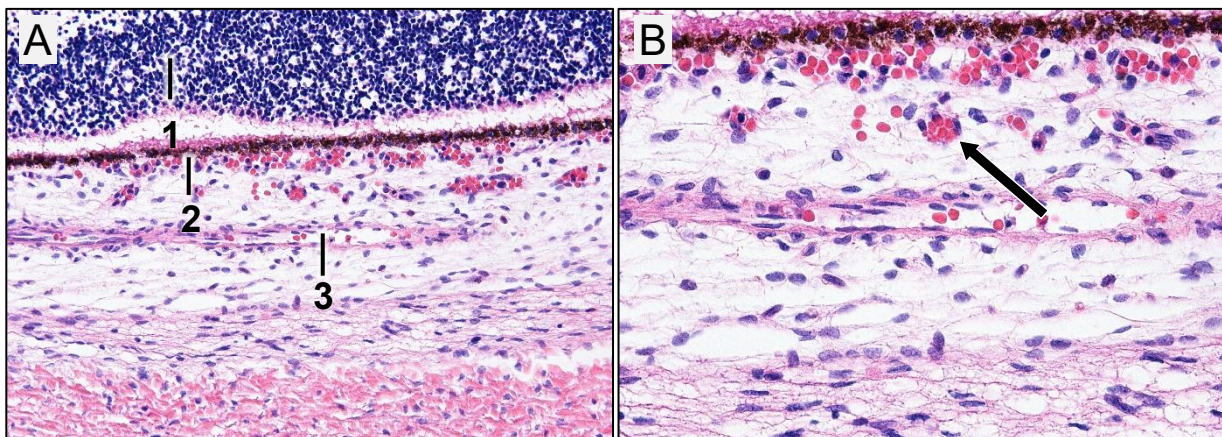


Abb. 4: Beispielhafte Darstellung der Aderhaut während der fetalen Entwicklung im Alter von 17 SSW, HE-Färbung. Gut zu erkennen sind die zahlreichen Blutgefäße innerhalb der Aderhaut (Pfeil). 1: Retina. 2: RPE. 3: Aderhaut. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung

1.5 Pränatale Entwicklung der Retina

Die Netzhaut (Retina), befindet sich zwischen Aderhaut und Glaskörper und stellt die für den Sehvorgang bedeutendste und komplexeste Struktur des Auges dar. Sie unterteilt sich in die der Lichtrezeption dienenden Pars optica retinae im hinteren Bereich des Bulbus oculi mit dem mehrschichtigen Stratum nervosum und die lichtunempfindliche Pars caeca retinae im anterioren Bereich jenseits der Ora serrata.

Die neurosensorische Retina entwickelt sich aus dem inneren Blatt des Augenbechers; das RPE als äußerste Schicht der Netzhaut entwickelt sich hingegen aus dem äußeren Augenbecherblatt. Die Neurogenese, die das komplexe neuronale Netzwerk der Retina generiert, vollzieht sich im Wesentlichen in drei präzise aufeinander abgestimmten Entwicklungsschritten. Zunächst findet die Differenzierung der retinalen Zellen aus multipotenten Vorläuferzellen statt, die dem durch rasche mitotische Zellteilung stark proliferierendem Neuroepithel entstammen (Amini et al., 2017). Im zweiten Schritt vollzieht sich die Ausbildung der retinalen Zellschicht-Architektur durch Migration der einzelnen Zelltypen an ihren Bestimmungsort und ihre Integration in das sich entwickelnde Gewebe (Amini et al., 2017). Anschließend erfolgt die Synaptogenese, die Verschaltung der Neurone untereinander (Amini et al., 2017). Durch gezielte Apoptose wird die für den Sehvorgang erforderliche Anzahl an Neuronen reguliert (Linden et al., 1999).

Die Entwicklung der Retina erfolgt nicht in allen Bereichen synchron, sondern verläuft beginnend von zentral nach peripher und von innen nach außen (Mann, 1950). Die folgende Darstellung konzentriert sich auf die Entwicklung der verschiedenen retinalen Zellschichten. Die Zeitangaben beziehen sich auf den zentralen Bereich der Retina. Bereits in der 5. SSW kommt es ventrikelnah durch eine hohe mitotische Aktivität zu einer starken Proliferation der Zellen in der Ventrikulärzone, der nach innen die azelluläre Marginalzone anliegt (Mann, 1950). In diesem Stadium lassen sich neben ovalen Zellkernen bereits runde Zellkerne beobachten (Mann, 1950). Der Übergang von einer ovalen in eine runde Form der Zellkerne ist ein morphologisches Zeichen der zellulären Differenzierung innerhalb der Retina (Mann, 1950; Spira und Hollenberg, 1973). In der 6. SSW haben sich durch zunehmende Migration von Zellen in die Marginalzone eine innere und äußere Neuroblastenschicht ausgebildet (Abb. 5) (Mann, 1950).

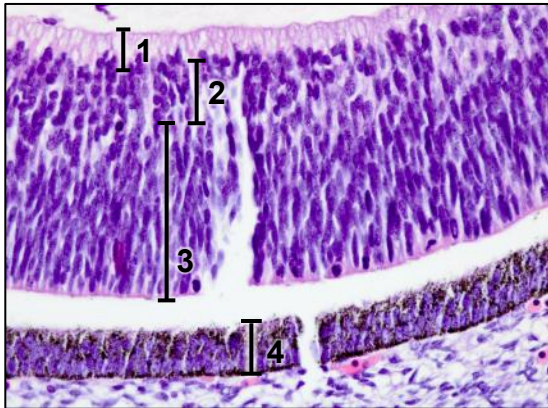


Abb. 5: Darstellung der Retina im Alter von 9 SSW. 1: Nervenfaserschicht. 2: Innere Neuroblastenschicht. 3: Äußere Neuroblastenschicht. 4: RPE. 200fache Vergrößerung. Modifiziert nach (Verdijk und Herwig-Carl, 2020)

Zwischen beiden Schichten liegt die transiente Chievitz-Schicht (Mann, 1950). In der Literatur finden sich uneinheitliche Angaben, bis zu welchem Entwicklungszeitpunkt die Chievitz-Schicht existiert, die Angaben reichen von einem Obliterieren in der 9. SSW bis zum 4. SSM (Spira und Hollenberg, 1973; Hinrichsen et al., 2014). Ausgelöst durch ein regulatorisches Netzwerk von Transkriptionsfaktoren entwickeln sich aus der inneren Neuroblastenschicht die Ganglienzellen, die Müllerzellen sowie die amakrinen Zellen (Daghsni und Aldiri, 2021; Mann, 1950). Aus der äußeren Neuroblastenschicht entstehen Photorezeptorzellen, Horizontalzellen und Bipolarzellen (Mann, 1950). Als erster differenzierter Zelltyp verlassen die Ganglienzellen ab der 7. SSW den Zellzyklus (Barishak, 2001). Die von den Ganglienzellen gebildete Nervenfaserschicht kann ab der 8. SSW ausgemacht werden (Spira und Hollenberg, 1973). Zeitgleich mit den Ganglienzellen lassen sich die Müllerzellen als eigenständiger Zelltyp ausmachen, deren vollständige Differenzierung allerdings noch weitere Zeit in Anspruch nehmen wird (Mann, 1950). Die amakrinen Zellen differenzieren sich ab der 11. SSW aus dem inneren Bereich der inneren Neuroblastenschicht (Rhodes, 1979). Während der 10. SSW separieren sich die Ganglienzellen deutlich von den restlichen Zelltypen der inneren Neuroblastenschicht und die innere plexiforme Schicht zwischen Ganglienzellen und innerer Neuroblastenschicht bildet sich aus (Spira und Hollenberg, 1973). Die Entwicklung der äußeren plexiformen Schicht setzt dagegen erst ab der 12. SSW ein (Spira und Hollenberg, 1973). Die Photorezeptoren beginnen sich ab der 10./11. SSW zu differenzieren, wobei sich zuerst die Zapfen entwickeln und die Stäbchen ab der 13. SSW nachfolgen (Rhodes, 1979). Die

Differenzierung der Horizontalzellen beginnt ab ca. der 16. SSW (Spira und Hollenberg, 1973). Die Bipolarzellen entwickeln sich aus dem zentralen Bereich der äußeren Neuroblastenschicht und sind die letzten retinalen Zelltypen, die sich ab der 18. SSW ausdifferenzieren (Abb. 6) (Rhodes, 1979).

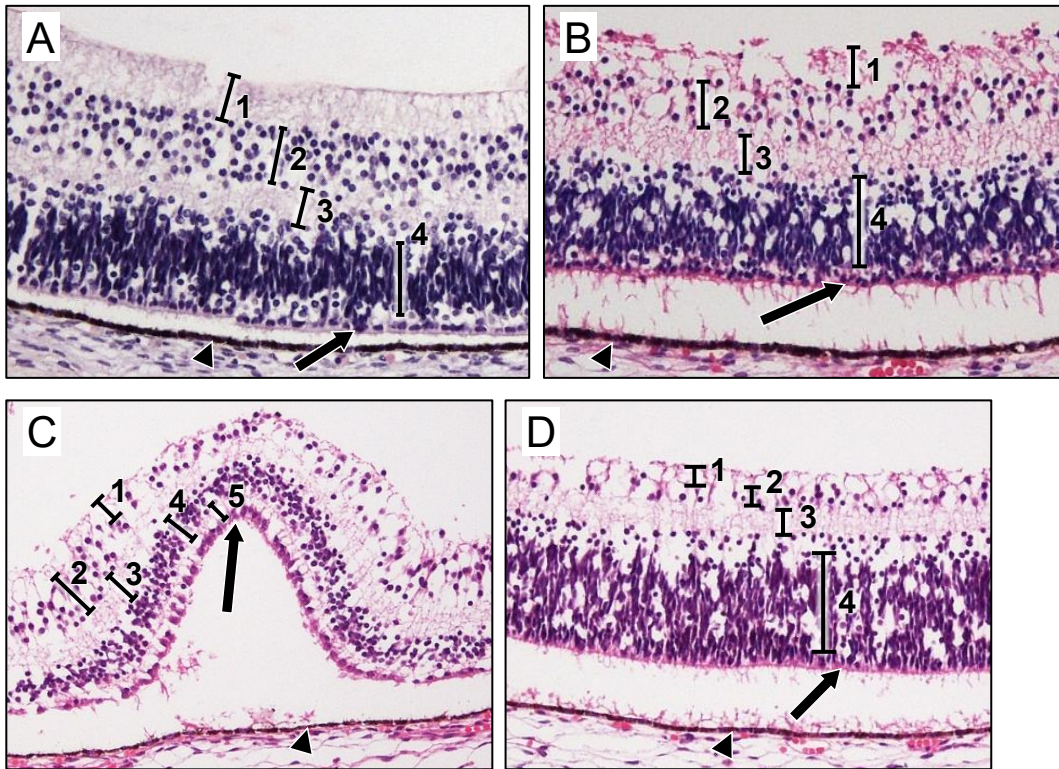


Abb. 6: Darstellung der zunehmenden Differenzierung der Retina während der Fetalperiode im Alter von 13 (A), 15 (B) und 19 (C, D) Gestationswochen, HE-Färbung. A, B: Zentrale Retina, 200fache Vergrößerung. 1: Nervenfaserschicht. 2: Ganglienzellschicht (GCL). 3: Innere plexiforme Schicht. 4: Zukünftige innere Körnerschicht (INL). Pfeil: Zukünftige Photorezeptoren. Pfeilspitze: RPE. C: Zentrale Retina, 100fache Vergrößerung. 1: Nervenfaserschicht. 2: GCL. 3: Innere plexiforme Schicht. 4: INL. 5: Äußere plexiforme Schicht. Pfeil: Äußere Körnerschicht (ONL). Pfeilspitze: RPE. D: Periphere Retina von C, 200fache Vergrößerung. 1: Nervenfaserschicht. 2: GCL. 3: Innere plexiforme Schicht. 4: zukünftige INL. Pfeil: zukünftige ONL. Pfeilspitze: RPE. Modifiziert nach (Verdijk und Herwig-Carl, 2020)

Spätestens ab der 25. SSW (Abb. 7) lassen sich in der zentralen Retina alle Schichten in ähnlicher Weise abgrenzen, wie sie auch in der adulten Retina zu beobachten sind (Verdijk und Herwig-Carl, 2020).

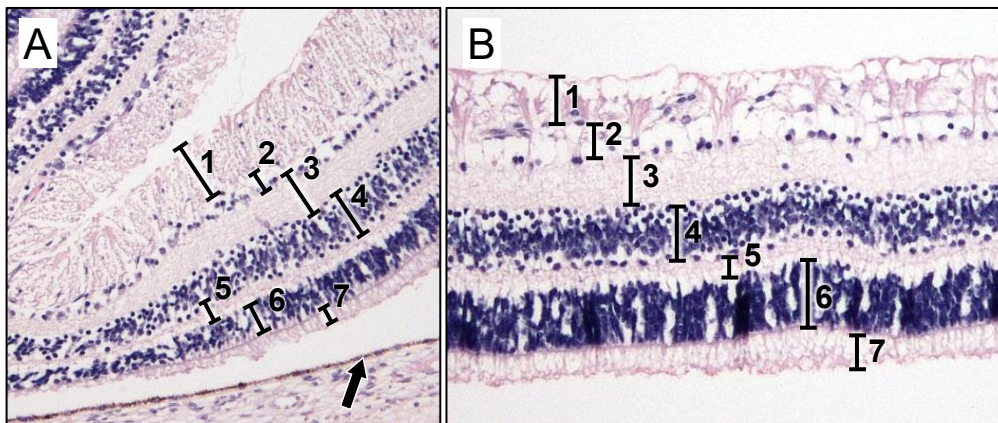


Abb. 7: Darstellung der Retina in der 25. SSW mit bereits adulter Konfiguration, HE-Färbung. A: Zentrale Retina, 100fache Vergrößerung. B: Periphere Retina, 200fache Vergrößerung. 1: Nervenfaserschicht. 2: GCL. 3: Innere plexiforme Schicht. 4: INL. 5: Äußere plexiforme Schicht. 6: ONL. 7: Photorezeptoren (Innen- und Außensegmente). Pfeil: RPE. Modifiziert nach (Verdijk und Herwig-Carl, 2020)

1.6 Epigenetik

Vor der Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahr 2003 ging man davon aus, dass der Mensch über eine entsprechend große Anzahl an Genen verfügen müsse. Statt der erwarteten über 100 000 Gene weist der Mensch bei einer Genomgröße von 3,1 Milliarden Basenpaaren (bp) aber nur ca. 20 000 proteincodierende Gene auf, während beispielsweise der Wasserfloh *Daphnia pulex* in seinem sehr viel kleineren Genom (200 Millionen bp) über 30 000 Gene besitzt (Colbourne et al., 2011; Horn, 2015; Schaaf und Zschocke, 2018). Die Komplexität des Menschen hängt somit nicht in erster Linie von der Anzahl seiner Gene ab, vielmehr stellt insbesondere auch die Regulation der Aktivität dieser Gene einen entscheidenden Faktor dar, der im Wesentlichen auf der Ebene der Epigenetik vollzogen wird.

1.6.1 Grundlagen der Epigenetik

Der Begriff Epigenetik wurde zum ersten Mal im Jahr 1942 von Conrad Waddington verwendet. Waddington subsumierte unter diesem Begriff sämtliche Prozesse, welche auf den Genotyp eines Lebewesens einwirken und damit die Ausbildung des Phänotyps beeinflussen (Waddington, 1942). Gemäß dem heutigen Verständnis kann die Epigenetik als ein sich gegenseitig beeinflussendes Netzwerk von Mechanismen angesehen werden, die oberhalb der Ebene des Genoms agieren, um unterschiedliche Aktivierungszustände zu erfassen, anzuzeigen oder aufrechtzuerhalten (Bird, 2007).

Epigenetische Mechanismen sind an der Kontrolle einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, die letztlich auf eine Regulation der Genexpression zurückzuführen sind. Dabei kann es zu Veränderungen kommen, die bereits in der frühen Entwicklung eines Organismus etabliert werden und permanent wirksam sind, wie bei dem genomischen Imprinting, bei dem eines der elterlichen Allele reprimiert ist (Horsthemke und Buiting, 2008; Murphy und Jirtle, 2003). Die zahlreichen verschiedenen, das gleiche Genom aufweisenden Zelltypen des menschlichen Körpers könnten ohne epigenetische Mechanismen nicht ihre phänotypischen Zellidentitäten und unterschiedlichen Funktionen ausbilden und aufrechterhalten. Die dabei etablierten zelltypspezifischen epigenetischen Veränderungen sind zum größten Teil reversibel und unterliegen unter einem multifaktoriellen Einfluss einem dynamischen Wandel (Bhutani et al., 2011). Damit steht das Epigenom, das die Gesamtheit aller epigenetischen Modifikationen einer Zelle bezeichnet, im Kontrast zum unveränderlichen Genom. Die daraus entstehende Plastizität der Genexpression ermöglicht die Anpassung der Zellen an intrinsische und extrinsische Veränderungen während der gesamten Lebensspanne. Wie das Genom wird das Epigenom bei mitotischen und meiotischen Zellteilungen auf die Tochterzellen übertragen (Probst et al., 2009).

Eine Vielzahl von Studien auf dem Gebiet der Epigenetik befasst sich mit dem Einfluss von Umweltfaktoren auf das Epigenom und den daraus resultierenden Veränderungen, die, wenn auch die Keimzellen betroffen sind, sich auch auf nachfolgende Generationen auswirken können (Feil und Fraga, 2012; Franklin und Mansuy, 2010; Jirtle und Skinner, 2007; Suter und Agaard-Tillery, 2009). Eine essentielle Rolle spielen epigenetische Regulationsmechanismen in der Embryonal- und Fetalperiode während Entwicklung und zellulärer Differenzierung sowie bei Alterungsprozessen (Ehrlich et al., 1982; Hackett und Surani, 2013; Pal und Tyler, 2016; Reik, 2007). Epigenetische Prozesse sind zudem, bei Fehlregulation des Epigenoms, an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie malignen Tumorerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen, Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen und Adipositas beteiligt (Gluckman et al., 2009; Kanwal und Gupta, 2012; Portela und Esteller, 2010; Qureshi und Mehler, 2011; Shi et al., 2022).

1.6.2 Epigenetische Regulationsmechanismen

Die bedeutendsten epigenetischen Mechanismen stellen die Methylierung der Nukleobase Cytosin, die die Chromatinstruktur beeinflussenden Modifikationen von basischen Histonproteinen und die Interferenz mit nicht-kodierenden RNA-Molekülen dar. In einem komplexen Zusammenspiel bestimmen diese epigenetischen Steuerungselemente darüber, ob Gene exprimiert oder stummgeschaltet werden. Beim Auge spielen epigenetische Mechanismen während der pränatalen Entwicklung eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung und Spezifizierung okulärer Gewebestrukturen, so etwa bei der Entwicklung der Retina und der Linsenbildung (Aldiri et al., 2017; Corso-Díaz et al., 2018; Cvekl und Duncan, 2007; Cvekl und Mitton, 2010; Daghsni und Aldiri, 2021; Raeisossadati et al., 2021). Eine Beteiligung epigenetischer Prozesse lässt sich bei einer Reihe von okulären Erkrankungen nachweisen, so lassen sich epigenetische Alterationen u.a. bei Retinoblastomen und Uveamelanomen nachweisen (Aldiri et al., 2017; Herwig-Carl et al., 2019). Epigenetische Veränderungen sind zudem an der Pathogenese der altersabhängigen Makuladegeneration sowie bei Retinitis pigmentosa und diabetischer Retinopathie beteiligt (Gemenetzi und Lotery, 2014; Zhang et al., 2017; Zibetti, 2022).

1.6.2.1 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung stellt den derzeit am besten erforschten epigenetischen Mechanismus dar. Die modifizierte Cytosinbase 5-Methylcytosin (5mC) entsteht durch die kovalente Bindung einer Methylgruppe an das C5-Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings der Nukleobase Cytosin (Abb. 8) und macht einen Anteil von ca. einem Prozent aller Nukleobasen innerhalb der DNA aus, wobei etwa vier bis fünf Prozent der Cytosinbasen diese Modifikation aufweisen (Ehrlich et al., 1982; Globisch et al., 2010). Die Methylierung findet an beiden komplementären Strängen der DNA statt; die Basenpaarung mit Guanin wird dadurch nicht beeinträchtigt. Die DNA-Methyltransferasen 1, 3A und 3B (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B) katalysieren diese Reaktion. DNMT1 sorgt während der Replikation für die Aufrechterhaltung der zelltypspezifischen Methylierungsmuster (Gowher und Jeltsch, 2018). DNMT3A und DNMT3B spielen während der pränatalen Entwicklung eine entscheidende Rolle und sind zuständig für die de-novo-Methylierung von Cytosinen und damit für die Etablierung von neuen DNA-Methylierungsmustern, abhängig von Entwicklungsstand und Zelldifferenzierung (Okano et al., 1999). Als Methylgruppendedonor fungiert

bei allen Methyltransferasen das Molekül S-Adenosylmethionin (SAM), das dabei zu S-Adenosylhomocystein (SAH) umgewandelt wird (Chen und Li, 2004).

Die Methylierung von Cytosin findet vorrangig an sogenannten 5'-Cytosin-Phosphat-Guanin-3'-Dinukleotiden (CpG-Dinukleotiden bzw. CpGs) statt (Bird, 2002). Diese lassen sich besonders häufig in nicht-kodierenden Abschnitten des Genoms finden (Ehrlich et al., 1982). Bereiche in der DNA-Sequenz, in denen überdurchschnittlich häufig die Purinbase Guanin auf ein Cytosin folgt, werden als CpG-Inseln bezeichnet (Gardiner-Garden und Frommer, 1987). CpG-Inseln sind in der Promotorregion oder im ersten Exon von ca. 70 Prozent aller Gene lokalisiert und liegen hier zum großen Teil unmethyliert vor, wodurch Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II Zugang zu den betreffenden Genabschnitten haben und die Transkription stattfinden kann (Jones, 2012; Li und Zhang, 2014; Schaaf und Zschocke, 2018). Treten an CpG-Inseln dagegen Methylierungen auf, wird die Bindung von Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II an ihre Zielsequenzen verhindert und die Transkription der entsprechenden Genbereiche unterbleibt (Campanero et al., 2000; Jaenisch und Bird, 2003). Daran sind unterschiedliche Mechanismen beteiligt. So wirkt 5mC als Bindungsstelle für verschiedene Proteine, welche die Anbindung von Transkriptionsfaktoren verhindern. Diese wiederum interagieren mit Histondeacetylasen, die eine Kondensierung der Chromatinstruktur im Promotorbereich bewirken und zusammen mit Histonmethyltransferasen die Unterdrückung der Genexpression verstärken (Fuks et al., 2003; Jones et al., 1998; Nan et al., 1998).

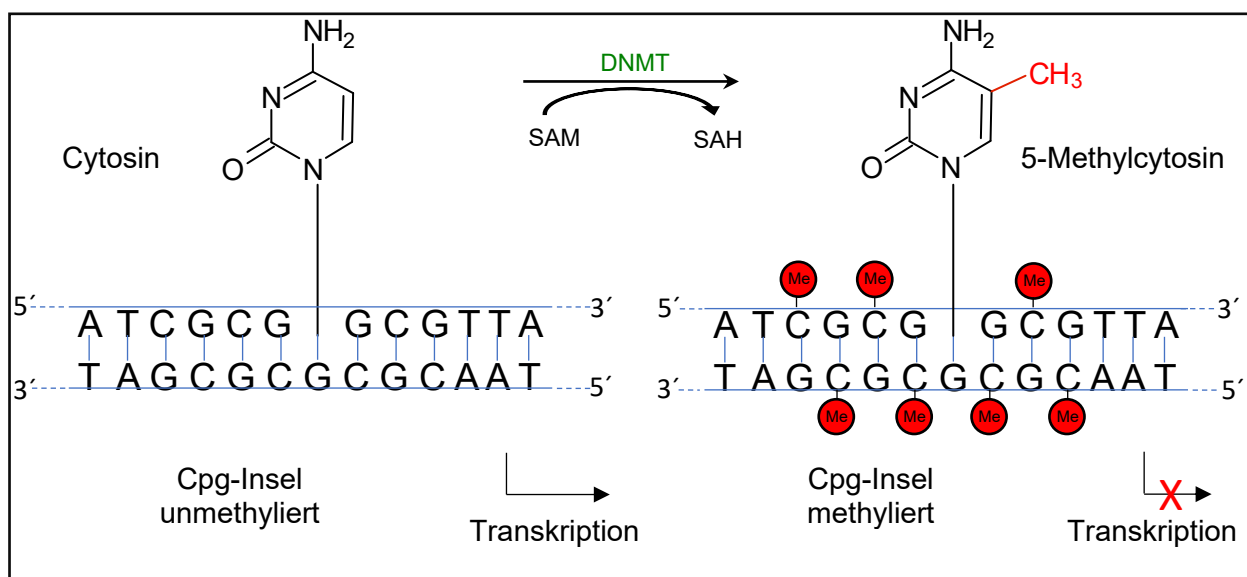


Abb. 8: Methylierung der Purinbase Cytosin. Me: Methylgruppe

1.6.2.2 DNA-Methylierung während der pränatalen Entwicklung

Eine essentielle Rolle kommt der DNA-Methylierung während der pränatalen Entwicklung zu. Bereits in der Präimplantationsphase findet eine umfassende Neuordnung des Epigenoms statt. Nach Bildung der Zygote durch Verschmelzung der Gameten kommt es zu einer globalen Demethylierung der parentalen Methylierungsmuster, von der nur wenige Bereiche ausgenommen sind, unter anderem die ca. 200 Gene, die vom Imprinting betroffen sind (Hackett und Surani, 2013; Reik, 2007). Dies ist entscheidend, um die Totipotenz der Zygote sicherzustellen (Sasaki und Matsui, 2008; Seisenberger et al., 2013). Die genomweite Remethylierung beginnt ab dem Stadium der Blastozystenbildung und wird von den de-novo-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B gesteuert, wobei Haushaltsgene und frühe Entwicklungsgene von der Methylierung ausgenommen sind (Cedar und Bergman, 2012; Haaf T, 2006; Hackett und Surani, 2013; Smith et al., 2012). Während der Migration der primordialen Keimzellen in die Gonadenanlage kommt es erneut zu weitreichenden Demethylierungen, in diesem Fall sind auch Gene betroffen, die dem Imprinting unterliegen (Hajkova et al., 2002; Sasaki und Matsui, 2008). Anschließend findet während des weiteren Reifungsprozesses der Gameten eine geschlechtsspezifische Remethylierung statt (Messerschmidt et al., 2014).

Während der Embryonalentwicklung werden, abhängig von Entwicklungsstand und zellulärer Differenzierung, neue Methylierungsmuster in den somatischen Zellen erstellt (Sliker et al., 2015). Im Verlauf der Fetalperiode zeigt sich, dass eine zunehmende Methylierung und damit einhergehende Repression von Entwicklungsgenen stattfindet, während eine Demethylierung in Genen, die für die Etablierung gewebespezifischer Funktionen zuständig sind, zu beobachten ist (Sliker et al., 2015). Dies führt schließlich zu spezifischen DNA-Methylierungsmustern in ausdifferenzierten Zellen, in denen nur jene Gene aktiv sind, die für die Funktion und Aufrechterhaltung der Zellidentität benötigt werden und so an nachfolgende Zellgenerationen weitergegeben werden.

Insbesondere während der Fetalperiode ist das Methylierungsmuster anfällig für Veränderungen (Brune und Brune, 2017). Dabei spielen nicht nur endogene Faktoren, die auf den Fetus in der intrauterinen Umgebung einwirken, eine Rolle. Studien zeigen, dass auch Umweltfaktoren, denen der maternale Organismus ausgesetzt ist, nicht nur dessen Methylierungsmuster beeinflussen, sondern auch die des Feten und sich permanent im fetalen Epigenom manifestieren können. Es konnte gezeigt werden, dass u.a. die mütterliche

Ernährungsweise während der Schwangerschaft, Rauchen, Alkoholkonsum sowie psychosoziale Stressoren Einfluss auf die Methylierungsmuster des fetalen Genoms nehmen (Breton et al., 2009; Radtke et al., 2011; Ramsay, 2010; Tobi et al., 2009). Die daraus resultierenden Veränderungen lassen sich häufig noch Jahre später nachweisen (Herberth et al., 2014). Untersuchungen weisen ferner darauf hin, dass die Prädisposition für eine Reihe von Erkrankungen im Erwachsenenalter ihren Ursprung in solchen pränatal erworbenen Aberrationen des Epigenoms haben können (Gluckman et al., 2009). Konsequenzen ergeben sich jedoch nicht nur für den Fetus selbst, denn diese Auswirkungen können auch die Keimzellen betreffen und somit an nachfolgende Generationen weitergegeben werden (Brune und Brune, 2017; Painter et al., 2008).

1.6.2.3 Hydroxymethylierung von Cytosinbasen

Bei der Base 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) handelt es sich um ein Oxidationsderivat von 5mC. 5hmC lässt sich in nahezu allen Gewebetypen nachweisen, meist jedoch nur in geringen Konzentrationen, wobei die Verteilung dieser modifizierten Cytosinbase, im Vergleich zu 5mC, sehr stark vom Gewebetyp abhängt (Globisch et al., 2010). Relativ hohe Konzentrationen finden sich im zentralen Nervensystem, wobei der cerebrale Cortex mit ca. 1,2 Prozent der Cytosinbasen den höchsten Gehalt an 5hmC im menschlichen Organismus aufweist (Wagner et al., 2015). 5hmC wird eine besondere Rolle bei der Demethylierung der DNA zugeschrieben, wenn stillgelegte Gene wieder aktiviert werden sollen, wobei zwischen aktiver, replikationsunabhängiger und passiver, replikationsabhängiger Demethylierung unterschieden wird (Wu und Zhang, 2014).

Im Zuge der aktiven Demethylierung von 5mC entsteht, durch Oxidation der Methylgruppe am Cytosin, 5hmC. Katalysiert wird die Reaktion von Enzymen aus der Gruppe der Ten-Eleven Translocation (TET) Proteinfamilie, von denen die drei Isoformen TET1, TET2 und TET3 bekannt sind (Tahiliani et al., 2009). Ein weiterer möglicher Weg der aktiven Demethylierung liegt in der direkten Desaminierung von 5mC zu Thymin. Nach weiteren Reaktionsschritten wird jeweils im Zuge der Basenexzisionsreparatur eine unmodifizierte Cytosinbase eingefügt (Pang et al., 2016; Weber et al., 2016).

Die passive Demethylierung tritt im Rahmen der Replikation auf, wenn die enzymatische Aktivität von DNMT1 inhibiert ist und somit die Methylierung des komplementären DNA-

Stranges unterbleibt. Während den nachfolgenden Replikationen wird durch den eintretenden Verdünnungseffekt 5mC entfernt. Zum anderen weist DNMT1 nur eine geringe Affinität zu 5hmC und dessen Oxidationsderivaten auf. Bei Vorhandensein einer solchen Cytosinmodifikation unterbleibt somit eine Modifizierung des Tochterstrangs (Pang et al., 2016; Valinluck und Sowers, 2007).

Während der Embryonalentwicklung ist 5hmC vor allem in euchromatischen Bereichen und vermehrt in Promotoren von aktiv transkribierten Genen lokalisiert, wobei es einer präzisen Regulierung unterliegt (Ficz et al., 2011). Dies zeigt sich an der unterschiedlich ausgeprägten Expression der TET-Enzyme, die eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Entwicklungspotentials und der Differenzierung embryonaler Zellen spielen. In der Zygote ist die TET3-Expression hochreguliert und dort für die schnelle aktive Demethylierung des paternalen Pronukleus und den daraus resultierenden Anstieg von 5hmC verantwortlich (Iqbal et al., 2011). In embryonalen Stammzellen werden dagegen TET1 und TET2 stark exprimiert (Wossidlo et al., 2011). Mit zunehmender Differenzierung der Stammzellen steigt die TET3-Expression an, während die von TET1 und TET2 abnimmt (Koh et al., 2011). TET1 und TET2 kommt somit eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz von Stammzellen zu, während TET3 bei Differenzierungsvorgängen von Bedeutung ist.

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass 5hmC eine eigene epigenetische Funktion ausübt und nicht, wie zunächst angenommen, lediglich ein Intermediat während der Demethylierung von 5mC darstellt (MacArthur und Dawlaty, 2021).

1.6.2.4 Modifikation von Histonproteinen

Damit die DNA in dem nur 10 µm großen Zellkern untergebracht werden kann, muss diese in hohem Maß kondensiert vorliegen. Dies kommt durch die Kopplung der DNA an Proteine zustande, zu denen die Histonproteine und Nicht-Histonproteine zählen. Der Komplex aus DNA und Proteinen wird als Chromatin bezeichnet. Die kleinste Organisationsebene des Chromatins stellt das Nukleosom dar, welches aus einem, aus jeweils zwei der vier Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4 zusammengesetzten Oktamer besteht (Abb. 9), um das ein ca. 147 bp umfassender Abschnitt der DNA gewickelt ist (Kouzarides, 2007). Die Stellen, an der die DNA sich an ein Histon-Oktamer anlagert und es wieder verlässt, werden von dem Histonprotein H1 besetzt, das den Nukleosomen Stabilität verleiht und eine

Rolle bei der weiteren Kondensation der DNA spielt (Graw, 2015; Schaaf und Zschocke, 2018). Zwischen den Nukleosomen liegt die zwischen 50 und 60 bp aufweisende Linker-DNA (Löffler et al., 2006). Die globulären Domänen der Histone bilden den Nukleosomenkern, um das der DNA-Basenstrang linksgängig in 1,75 Windungen verläuft (Graw, 2015). Während die carboxyterminalen Enden der Histone überwiegend im Nukleosomenkern liegen, ragen ihre flexiblen aminoterminalen, bis zu 40 Aminosäuren umfassenden Schwanz-Domänen aus dem Oktamer heraus (Luger et al., 1997).

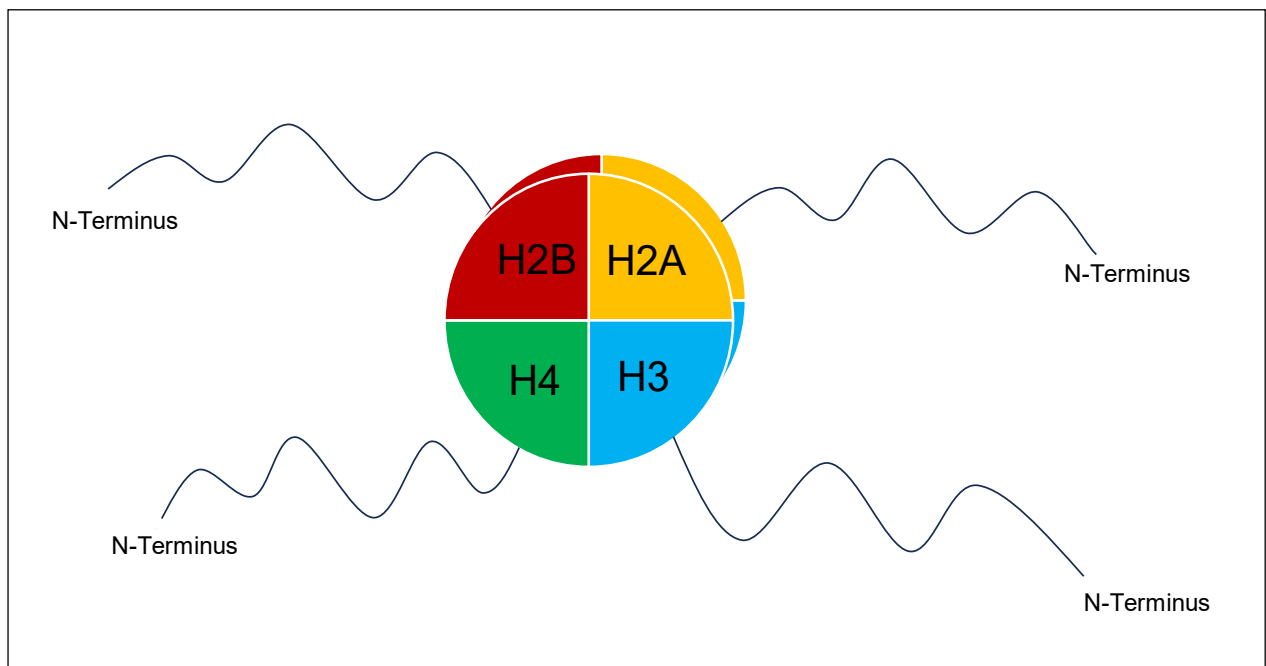


Abb. 9: Schematische Darstellung des Histon-Oktamers mit N-terminalen Aminosäuresequenzen

Die Chromatinstruktur ist essentiell für die Regulation der Genaktivität. Chromatin kann als hoch kondensiertes, transkriptionsinaktives Heterochromatin oder dekondensiertes, transkriptionsaktives Euchromatin vorliegen. Heterochromatin ist, neben der Regulation der Genaktivität und der Aufrechterhaltung der Zellidentität, bedeutend für die Stabilität der Chromosomen und die regelrechte Chromosomensegregation. Im Euchromatin befinden sich Genbereiche mit aktiver Transkription. Es liegt eine aufgelockerte Chromatinstruktur vor, Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II erhalten dadurch Zugang zu ihren Zielsequenzen und weitere Bindungsstellen für transkriptionsfördernde Cofaktoren werden freigegeben, wodurch die Expression der entsprechenden Gene erfolgen kann.

Histonmodifikationen sind chemische Modifizierungen, die posttranslational an spezifischen Aminosäureresten von Histonproteinen erfolgen. Insbesondere ihre aminoterminalen Aminosäuresequenzen (N-Termini) können durch die kovalente Addition von funktionellen Gruppen modifiziert werden. Solche enzymatisch katalysierten und reversibel verlaufenden Modifizierungen führen, in Abhängigkeit von den angefügten Molekülen, zu einer veränderten Kondensation der Chromatinstruktur sowie zu Veränderungen des DNA-Bindungsverhaltens an die Histone und beeinflussen die Interaktion mit Nicht-Histonproteinen sowie die der Nukleosomen untereinander (Kouzarides, 2007).

Es sind vielfältige posttranslationale Modifikationen (PTMs) beschrieben, zu den bedeutendsten zählen die Methylierung von Lysin und Arginin, die Acetylierung von Lysin, sowie die Phosphorylierung von Serin und Threonin (Bannister und Kouzarides, 2011). PTMs können bei allen Histonproteinen beobachtet werden, bevorzugt erfolgen sie an H3-Histonen, deren lysin- und argininreichen N-Termini am weitesten aus dem Nukleosomenkern herausragen, sowie an den aminoterminalen Schwanzdomänen von H4-Histonen (Keppler und Archer, 2008). Acetylierungen und Phosphorylierungen bewirken eine Neutralisierung der unter physiologischen Bedingungen positiv geladenen Seitenkette von Lysin, wodurch sich die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen Histon und negativ geladener DNA verringern, was zu einer aufgelockerten Chromatinstruktur führt (Choudhuri et al., 2010).

1.7 Fragestellung

Das Ziel dieser Studie besteht darin, Informationen über den epigenetischen Status während der physiologischen Entwicklung des menschlichen Auges in der Fetalzeit zu erhalten. Zur Charakterisierung von epigenetischen Veränderungen wurden immunhistochemische Färbungen von humanen fetalen Augen mit verschiedenen Antikörpern angefertigt, die spezifisch gegen bestimmte epigenetische Marker gerichtet sind. Dabei soll insbesondere auf folgende Fragestellungen näher eingegangen werden:

1. In welchen okulären Strukturen lassen sich die untersuchten Antigene nachweisen?
2. Bestehen Unterschiede in der Ausprägung der epigenetischen Modifikationen im Verlauf der Fetalperiode?
3. Lassen sich Differenzen zwischen einzelnen Zelltypen, insbesondere in der Retina, feststellen?

4. Bestehen Unterschiede im Färbeverhalten zwischen den zentralen und peripheren Bereichen der Retina bzw. zwischen zellulären Differenzierungsstufen?
5. Zeigen sich Zusammenhänge zwischen den untersuchten epigenetischen Modifikationen, insbesondere in der Retina?
6. Gibt es Gemeinsamkeiten im Färbungsmuster bei fetalen und adulten Augen und bestehen geschlechtsabhängige Unterschiede?

2. Material und Methoden

2.1 Gewebe

In dieser Studie wurden 34 Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete Augen untersucht, welche von humanen Feten der 11. bis 38. Gestationswoche stammten (Abb. 10). Die Kohorte bestand aus 17 weiblichen und 17 männlichen Feten. Die fetalen Augen wurden vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt und sind dort im Zuge fetaler Obduktionen entnommen worden. Voraussetzung für die Obduktion und den Einschluss in die Studie war eine schriftliche Einverständniserklärung der Eltern sowie eine Fixierung der Augen in Formaldehyd. In die Kohorte wurden grundsätzlich nur Feten eingeschlossen, deren Todesursache bekannt war und die keine Syndrome aufwiesen, die sich durch eine okuläre Beteiligung manifestieren können. Eine Ausnahme stellte ein Fall dar, bei dem die Todesursache nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Um eine erkennbare pathologische Situation auszuschließen, wurden die Augen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf Fehlbildungen untersucht. Das Vorhandensein von makroskopischen oder mikroskopischen Anomalien stellte ein Ausschlusskriterium dar. Es wurden keine Feten in die Untersuchung eingeschlossen, die an Krankheiten litten, die bekanntermaßen auf epigenetischen Veränderungen beruhen. Pro Fet wurde ein Auge in die Studie eingeschlossen. Um den Status der epigenetischen Modifikationen zwischen Fetalperiode und adultem Auge vergleichen zu können, dienten elf adulte Augen als Vergleichsgewebe. Jegliche Untersuchungen wurden gemäß der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Ein gültiges Ethikvotum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn lag vor Beginn der Studie vor (Nummer des Ethikantrags: 227/11).

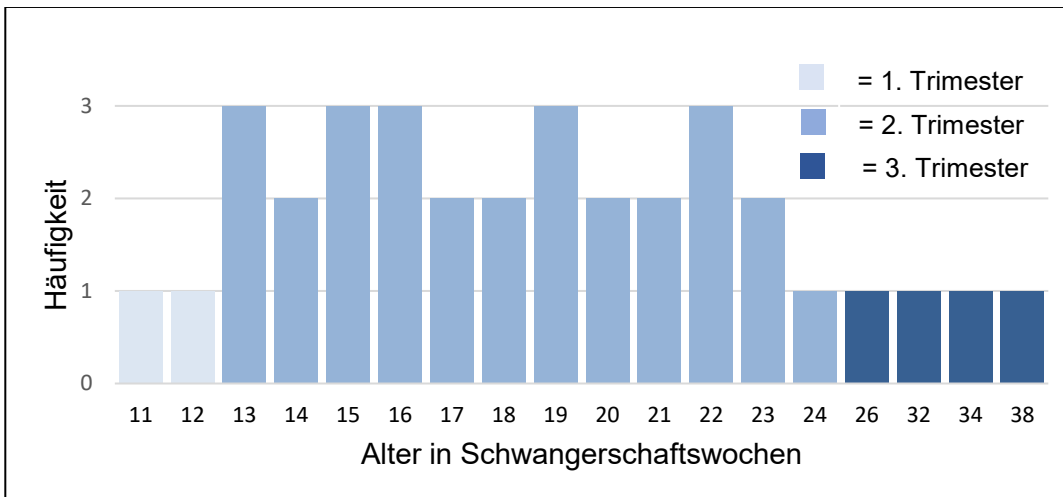


Abb. 10: Altersverteilung innerhalb der untersuchten Kohorte

2.2 Antikörper

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit vier verschiedenen unkonjugierten Antikörpern der Klasse IgG durchgeführt (Tab. 1). Die polyklonalen Antikörper Anti-acetyl-Histon H3 (Anti-H3Ac) und Anti-acetyl-Histon H4 (Anti-H4Ac) stammen von Kaninchen und weisen eine spezifische Immunreaktivität gegenüber acetylierten Lysin-Seitenketten innerhalb des N-Terminus der Histonproteine H3 bzw. H4 auf. Die monoklonalen Antikörper Anti-5-methylcytosin (Anti-5MeC) und Anti-5-hydroxymethylcytosin (Anti-5hMeC) stammen aus murinen Zellen und binden selektiv an die Nukleinbasen 5mC bzw. 5hmC.

Tab. 1: Kenndaten und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Klonalität, Herkunft	Katalognummer	Firma	Verdünnung
Anti-H3Ac	Polyklonal, Kaninchen	06-599	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:200
Anti-H4Ac	Polyklonal, Kaninchen	06-866	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:2500
Anti-5MeC	Monoklonal, Maus	NBP2-42814	Novus Biologicals, Darmstadt, Deutschland	1:150
Anti-5hMeC	Monoklonal, Maus	MA5-23525	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland	1:1500

2.3 Zuschnitt der fetalen Augen

Nach der E nukleation der Augen wurden diese zunächst über einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Für die makroskopische Beurteilung wurde das Auge zunächst diaphanoskopiert und vermessen. Äußere Veränderungen und die Ergebnisse der Diaphanoskopie wurden dokumentiert und ggf. fotografiert. Zur Eröffnung des Auges wurde im Regelfall eine horizontale Schnittführung durch die Pupillarebene gewählt. Anschließend erfolgte die Inspektion der okulären Strukturen, dabei wurde ein Operationsmikroskop zu Hilfe genommen. Makroskopische Auffälligkeiten wurden ebenfalls dokumentiert und fotografiert (Herwig-Carl et al., 2017; Verdijk und Herwig-Carl, 2020). Nach der makroskopischen Beurteilung wurde der Bulbus in toto in Paraffin eingebettet. Zur mikroskopischen Beurteilung wurden Stufenschnitte angefertigt, die jeweils mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und mittels Perjodsäure-Schiff-Reaktion gefärbt wurden. Diese Präparate wurden lichtmikroskopisch nach morphologischen Anomalien untersucht, anschließend konnte das Material für Forschungszwecke herangezogen werden. Der Zuschnitt der fetalen Augen und die histologische Routinebeurteilung wurden bereits im Vorfeld der Studie durchgeführt.

2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie bezeichnet eine Untersuchungsmethode, welche dem Nachweis eines bestimmten Moleküls mithilfe eines gegen dieses Molekül gerichteten Antikörpers in Gewebeschnitten dient. Wird ein Immunglobulin einem Antigen im Gewebe ausgesetzt, kommt es zur spezifischen Bindung zwischen dem Fab-Fragment des Antikörpers und dem komplementären Epitop, dem Molekülbereich des Antigens, das für die Auslösung der Immunantwort verantwortlich ist. Die Visualisierung dieser Antigen-Antikörper-Reaktion erfolgt durch eine enzymatische Farbstoffumsetzung. Die technisch einfachste Methode besteht dabei in der Verwendung eines Antikörpers, an den über eine kovalente Bindung ein Enzym gekoppelt ist. Inzwischen werden häufig Methoden eingesetzt, mit denen eine signifikante Signalverstärkung erreicht wird, indem pro Antikörperbindungsstelle mehrere Enzyme zur Farbstoffumsetzung zur Verfügung stehen. Im Augenbereich wird bevorzugt 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als rötliches Chromogen eingesetzt, da das Auge selbst mehrere pigmentierte Strukturen enthält und somit das eine bräunliche

Färbung erzeugende 3,3'-Diaminobenzidin eine Abgrenzung vom regulären Pigment des Auges erschweren kann.

Im Nachfolgenden werden die einzelnen Schritte der durchgeführten immunhistochemischen Färbungen beschrieben. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, sofern dies nicht anders angegeben wird.

2.4.1 Vorbereitung des Gewebes

Von den in Paraffinblöcken eingebetteten fetalen Augen wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms Schnitte mit einer Schnittdicke von jeweils 5 µm angefertigt. Die gewonnenen Schnitte wurden in ein Paraffin-Streckbad mit 40 °C warmem Aqua destillata überführt. Von der Wasseroberfläche wurden die Schnitte auf Glasobjektträger aufgezogen und für mindestens 16 Stunden in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 38 °C inkubiert. Dadurch wird das überschüssige Wasser zwischen Glas und Paraffinschnitt entfernt, die Haftung des Präparats am Glas des Objektträgers wird durch elektrostatische Wechselwirkungen gewährleistet (Lang, 2013). Nach der Inkubation im Wärmeschrank wurden die Präparate mithilfe von Xylol entparaffiniert. Dazu wurden die Objektträger in zwei nacheinander verwendeten Xylolbädern für jeweils 5 Minuten inkubiert. Zur Rehydrierung des Gewebes wurden die Präparate einer Alkoholreihe mit abnehmendem Konzentrationsgradienten ausgesetzt. Dazu wurden die Schnitte nacheinander jeweils für 3 Minuten zweimal in 100%igen 2-Propanol und je einmal in 96%igen, 80%igen und 70%igen 2-Propanol inkubiert. Eine sich anschließende Spülung mit Aqua destillata diente der Entfernung des Isopropanols.

2.4.2 Epitopdemaskierung

Die Formalinfixierung kann zu Veränderungen der Epitopstruktur durch die Bildung sogenannter Cross-Links führen. Dabei handelt es sich um chemische Quervernetzungen innerhalb eines Proteins (intramolekulare Cross-Links) oder zwischen Proteinen (intermolekulare Cross-Links) (French und Edsall, 1945; Helander, 1994). Durch eine daraus möglicherweise resultierende abweichende Struktur des Epitops kann die Immunreaktivität gegenüber den spezifischen Antikörpern verloren gehen. Zur Wiederherstellung der Im-

munreaktivität, der sogenannten Epitopdemaskierung, lassen sich zwei Verfahren unterscheiden: Einerseits der Einsatz proteolytischer Enzyme, andererseits das Erhitzen in einem Mikrowellenherd in Kombination mit Pufferlösungen (McNicol und Richmond, 1998). Bei der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikrowellenbehandlung mit Citratpuffer gewählt. Dazu wurde zunächst die Pufferlösung in einem Mikrowellenherd für 5 Minuten bei einer Leistung von 750 Watt erwärmt. Anschließend wurden die Präparate in den Citratpuffer gegeben und für 15 Minuten einer Mikrowellenbehandlung bei einer Leistung von 750 Watt unterzogen. Nach dieser Zeit kühlten die Objektträger bei Raumtemperatur für 30 Minuten im Puffer ab. Im Anschluss daran wurden die Präparate für 5 Minuten mehrmals in kaltes Leitungswasser gegeben und nachfolgend mit Aqua destillata gespült.

2.4.3 Proteinblockierung

Neben der spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion kann es im Gewebe zu unspezifischen Protein-Protein-Interaktionen kommen, welche durch eine erhöhte Hintergrundfärbung die Qualität einer immunhistochemischen Färbung beeinträchtigen können (Ramos-Vara, 2005). Um solche Interaktionen zwischen Gewebeproteinen und Antikörpern zu verhindern, besteht die Möglichkeit, durch Zusatz von Proteinen oder Protein-Blockierungsreagenzien hydrophobe Bindungsstellen abzusättigen (Ramos-Vara, 2005).

Dazu wurden die Gewebeschnitte für 30 Minuten in eine Lösung gegeben, die aus Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) und 5 Prozent bovinem Serumalbumin (5%iges TBS/BSA) bestand. Im Anschluss wurden die Präparate zweimal für jeweils 10 Minuten mit 1%igem TBS/BSA inkubiert und die Flüssigkeit auf den Objektträgern abgesaugt. Auf das Gewebe wurde ein serumfreies Proteinblockierungsreagenz aufgetragen, das nach einer 10-minütigen Inkubationszeit durch Absaugen wieder entfernt wurde.

Die Inkubation mit 1%igem TBS/BSA diente nicht nur in diesem Schritt der Blockierung der Proteine, sondern wurde zu diesem Zweck auch in den weiteren Arbeitsschritten fortgesetzt. Des Weiteren wurden die Antikörper-Verdünnungsmedien mit dieser Pufferlösung angesetzt.

2.4.4 Primärantikörper

Die Primärantikörper wurden mit 1%igem TBS/BSA angesetzt (Verdünnungen siehe Tab. 1). Diese Antikörperlösungen wurden auf die vorbereiteten Gewebeschnitte aufpipettiert

und über einen Zeitraum von mindestens 16 Stunden in einer feuchten Kammer bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Durch die Nutzung einer feuchten Kammer wurde gewährleistet, dass es nicht zum Austrocknen der Präparate kam und damit eine effektive Exposition zwischen Antikörper und Gewebe stattfinden konnte. Vor den weiteren Arbeitsschritten wurden die Präparate für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und darauffolgend mit Aqua destillata gespült, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Um sicherzustellen, dass die Entwicklung einer Farbreaktion das Vorhandensein des Antigens einschließt, wurde für jedes der 34 Präparate eine Negativkontrolle durchgeführt. Dazu wurden alle Schritte auf identische Weise durchgeführt, lediglich der Zusatz des Primärantikörpers entfiel.

2.4.5 Inhibition endogener Peroxidase-Aktivität

Je nach Gewebeart kann eine unterschiedlich stark ausgeprägte endogene Peroxidase-Aktivität vorhanden sein. Diese Eigenschaft kann sich negativ auf die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen auswirken, da es zu einer Farbstoffumsetzung kommt, die unabhängig von der Antigen-Antikörper-Reaktion verläuft. Durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid lässt sich die Enzymaktivität durch einen Überschuss an Substraten inhibieren (Lang, 2013). Zu diesem Zweck wurden die Präparate für 10 Minuten in eine 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung überführt. Anschließend wurden die Objektträger mit Aqua destillata gespült und zweimal für jeweils 10 Minuten in 1%igem TBS/BSA gelagert. Der Puffer wurde vor der weiteren Verarbeitung abgesaugt. Bei den nachfolgenden Schritten wurden für die verschiedenen Antikörper unterschiedliche Methoden gewählt.

2.4.6 Labelled Streptavidin-Biotin-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen für den Antikörper Anti-5MeC wurden nach der Labelled Streptavidin-Biotin-Methode durchgeführt. Bei dieser Methode kam ein mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper zum Einsatz, der speziesspezifisch an den Primärantikörper bindet. Anschließend wurde Streptavidin hinzugegeben, welches mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Als Sekundärantikörper diente ein polyklonaler, biotinylierter Antikörper der Klasse IgG, der gegen Antikörper von Maus und Kaninchen gerichtet ist und aus der Spezies Pferd stammt (Anti-Mouse/Rabbit IgG, biotinylated, Art.-Nr.: ZU114; Nordic MUBio). Der Antikörper wurde mit 1%igem TBS/BSA angesetzt,

um eine Verdünnung von 1:50 zu erzielen, diese Lösung wurde auf die Präparate aufpipettiert und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden überschüssige Sekundärantikörper durch Spülen mit Aqua destillata entfernt. Die Gewebeschnitte wurden für zweimal 10 Minuten in 1%igem TBS/BSA inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und der Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Streptavidin/HRP, Code-Nr. P0397; Dako) mit 1%igem TBS/BSA verdünnt, bis eine Verdünnung von 1:300 erreicht wurde. Diese Lösung wurde aufgetragen und für 60 Minuten inkubiert. Zum Entfernen von nicht gebundenen Molekülen wurden die Präparate in Aqua destillata gewaschen und anschließend für je dreimal 10 Minuten in TBS-Puffer gelagert.

2.4.7 Polymerkonjugat-Methode

Die immunhistochemischen Färbungen für die Antikörper Anti-H3Ac, Anti-H4Ac und Anti-5hMeC wurden nach der Polymerkonjugat-Methode durchgeführt. Dabei kommt ein Komplex zum Einsatz, dessen Grundgerüst ein Polymer bildet, an welches Antikörper und Enzyme gekoppelt sind. Bei den konjugierten Antikörpern handelt es sich um Immunglobuline aus Ziegen, die speziesspezifisch gegen Kaninchenantikörper reagieren. Um eine Reaktivität gegenüber Mausantikörpern zu gewährleisten, können zusätzlich unkonjugierte Kaninchenantikörper, die gegen Mausantikörper gerichtet sind, hinzugegeben werden. Die Reagenzien wurden gemäß den Herstellerangaben des Produkts (Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC IHC Detection Kit – Micropolymer (ab236467); Abcam) verwendet. Die gegen den Primärantikörper gerichteten, unkonjugierten Kaninchenantikörper wurden auf die Gewebeschnitte aufgetragen und für einen Zeitraum von 10 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Präparate zwecks Entfernung nicht gebundener Antikörper zweimal mit 1%igem TBS/BSA gespült und die Flüssigkeit durch Absaugen entfernt. Im Anschluss wurde der Komplex aus Polymer, Sekundärantikörper gegen Kaninchenantikörper und HRP auf das Gewebe aufpipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von nicht gebundenen Molekülen wurden die Präparate viermal in 1%igem TBS/BSA gewaschen. Nach den in Kapiteln 2.4.6 und 2.4.7 beschriebenen Verfahren gelten die folgenden Beschreibungen für alle Antikörper.

2.4.8 Farbreaktion, Gegenfärbung und Eindecken

Um eine Farbreaktion auszubilden, erfolgte die Zugabe einer Lösung mit dem Chromogen AEC. Die Enzymaktivität der HRP führt zu einer Reduktion des in der Chromogenlösung enthaltenen Wasserstoffperoxids, im Gegenzug wird AEC zu einem roten Farbprodukt oxidiert. Die Pufferlösung wurde abgesaugt, die AEC-Lösung auf die Gewebeschnitte aufgetragen und für 25 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Objektträger mit Aqua destillata gespült. Die anschließend durchgeführte Färbung mit Hämalaun nach Mayer diente als blaue Gegenfärbung zu den durch das AEC rot gefärbten Kernen. Dazu wurden die Präparate für 5 Minuten in Hämalaun-Lösung inkubiert. Nachfolgend erfolgte die Spülung der Präparate für 5 Minuten mit lauwarmem Leitungswasser und darauffolgend mit Aqua destillata. Anschließend wurden die Präparate mithilfe eines wasserlöslichen Eindeckmittels und einem Deckglas abgedeckt.

2.5 Semiquantitative Auswertung der Farbreaktion

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte lichtmikroskopisch. Untersucht wurde die Ausprägung der nukleären Farbreaktion der jeweiligen epigenetischen Marker in verschiedenen okulären Strukturen. Zu den untersuchten okulären Strukturen zählten Kornea, Kammerwinkel, Chorioidea und Retina, wobei die Retina in einen zentralen und einen peripheren Bereich aufgeteilt wurde und jeweils die ONL, INL und GCL einzeln bewertet wurden, soweit diese entwicklungsbedingt abgrenzbar waren. Für das RPE wurde die Sichtbarkeit einer Farbreaktion überprüft. Zur Auswertung der übrigen Strukturen wurde ein Score verwendet, in welchen die Intensität der Färbung und der Anteil der gefärbten Zellkerne einfließen. Für die Intensität der Farbreaktion wurden Werte zwischen 0 und 3 vergeben, für den Anteil der gefärbten Zellkerne Werte zwischen 0 und 4 (Tab. 2). Die beiden ermittelten Werte für jede Lokalisation wurden miteinander multipliziert und ergaben den verwendeten Farbscore.

Tab. 2: Score zur Bewertung des Anteils der gefärbten Zellkerne und der Farbintensität

Anteil der gefärbten Zellkerne		Farbintensität	
0	Keine Farbreaktion nachweisbar	0	Keine Farbreaktion nachweisbar
1	Farbreaktion bei unter 25 % der Zellkerne	1	Schwache Farbintensität
2	Farbreaktion bei 25 % bis 50 % der Zellkerne	2	Mittelstarke Farbintensität
3	Farbreaktion bei 50 % bis 75 % der Zellkerne	3	Starke Farbintensität
4	Farbreaktion bei über 75 % der Zellkerne		

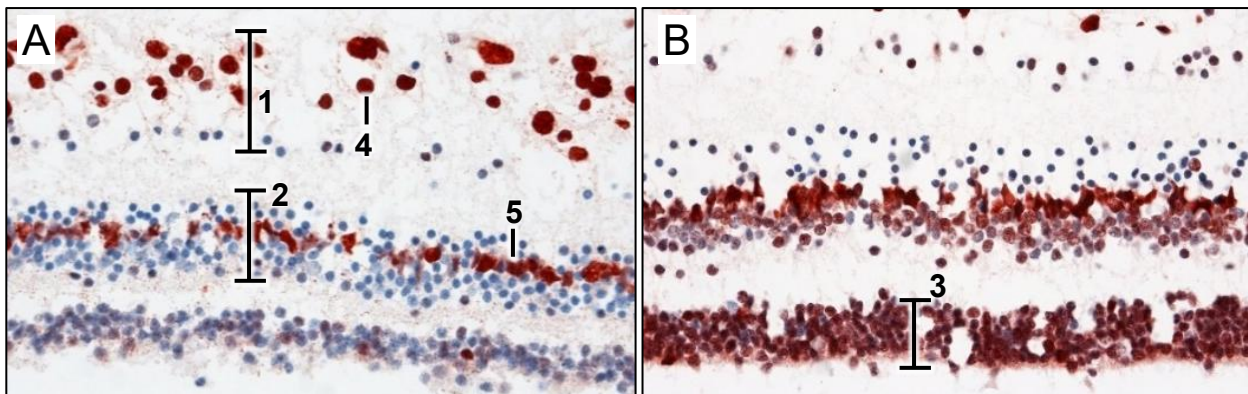


Abb. 11: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Färbungen zur Erläuterung des Farbscores (Antikörper Anti-H4Ac) an der zentralen Retina. 400fache Vergrößerung. A: 22. SSW. 1: GCL. 2: INL. B: 23. SSW. 3: ONL. In A sind die Zellkerne der Ganglienzellen (4) und der Müllerzellen (5) im Gegensatz zu den übrigen Zelltypen stark angefärbt

An den beiden Präparaten in Abbildung 11 wird die Anwendung des Farbscores beispielhaft demonstriert. In der GCL waren mehr als 50 Prozent, aber weniger als 75 Prozent der Zellkerne (Score 3) mit einer starken Intensität (Score 3) gefärbt. Damit ergibt sich ein Farbscore für die GCL von 9. In der INL ergab sich bei deutlich weniger als 25 Prozent der Zellkerne (Score 1) eine intensive Farbreaktion (Score 3). Der Farbscore in der INL liegt demnach bei 3. In der ONL eines anderen Präparates zeigte sich bei deutlich über 75 Prozent der Zellkerne (Score 4) eine intensive Anfärbung (Score 3); der Farbscore liegt bei dem maximal möglichen Wert 12. Zur Auswertung wurden die verschiedenen anatomischen Strukturen des Auges betrachtet und für diese gemäß dem oben beschriebenen Auswertungsschema durch zwei unabhängige Untersuchende (Michael Thorsten Jost, Martina C. Herwig-Carl) jeweils ein separater Wert des Farbscores ermittelt. Für jede

Struktur wurde der Mittelwert der Ergebnisse der beiden Auswertenden berechnet. Mit diesen Werten wurde die statistische Analyse durchgeführt. Von 1174 untersuchten Einzelstrukturen zeigten weniger als 10 Prozent der Fälle eine Abweichung von mehr als zwei Punkten im Farbscore. Der Einfluss von individuellen Faktoren auf die Bewertung der Präparate mittels des Scores ist demzufolge als gering einzuschätzen.

2.6 Morphologische Auswertung der retinalen Zellarchitektur

Neben der semiquantitativen Auswertung des Farbscores wurde zudem die Ausprägung der Farbreaktion der verschiedenen Zelltypen innerhalb der retinalen Schichten näher betrachtet. Die einzelnen retinalen Zelltypen wurden in den jeweiligen Präparaten identifiziert, soweit diese entwicklungsbedingt bereits differenziert waren. Zur Identifizierung der retinalen Zelltypen wurde sich im Wesentlichen an den Ergebnissen von Ida Mann orientiert, die bereits Anfang des 20. Jahrhunderts die Schichtung und Morphologie der retinalen Zellen während der fetalen Entwicklung beschrieben hat und deren Werk bis heute von vielen Autoren als Standardwerk angesehen wird (Mann, 1950). In Abbildung 11 waren beispielsweise die Zellkerne der Ganglienzellen intensiv angefärbt. Unter den Zellkernen der Zellen der inneren Körnerschicht waren lediglich die Kerne der Müllerzellen stark angefärbt, die Kerne von amakrinen Zellen, Bipolarzellen und Horizontalzellen waren nicht angefärbt. Unter den Kernen der Photorezeptorzellen zeigte sich nur eine minimale Färbung.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Softwareprogramm IBM SPSS Statistics 27. Als statistische Testverfahren wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson, der Kruskal-Wallis-Test, der Mann-Whitney-U-Test, sowie der Eta-Quadrat-Koeffizient verwendet. Das gewählte Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$. Zur genaueren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Gestationsalter und Farbscore erfolgte eine Einteilung in Trimester. Signifikante Unterschiede wurden dabei mittels Kruskal-Wallis-Test aufgedeckt, im Falle eines positiven Kruskal-Wallis-Tests wurden die einzelnen Altersgruppen paarweise mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede untersucht.

2.8 Geräte und Reagenzien

Die verwendeten Geräte und Reagenzien und deren Hersteller sind in den Tabellen 3 und 4 aufgelistet, exklusive der Primärantikörper (Tab. 1).

Tab. 3: Übersicht der verwendeten Geräte

Gerät	Firma
Rotationsmikrotom HM 335E	Microm
Paraffin-Streckbad	LAUDA-GFL
Objekträger HistoBond®	Paul Marienfeld
Wärmeschrank S40	Memmert
Mikrowellenherd MW 7869	SEVERIN Elektrogeräte
Absauggerät: Mini-Membran-Vakuumpumpe LABOPORT® N 86	KNF Neuberger
Deckgläser	Engelbrecht
Lichtmikroskop BX 41	Olympus
Kamera DS-Vi1	Nikon

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Reagenzien. BSA: Bovines Serumalbumin. IgG: Immunglobulin G. TBS: Tris-gepufferte Kochsalzlösung. HRP: Meerrettichperoxidase. AEC: 3-Amino-9-Ethylcarbazol

Reagenzien	Firma
Aqua destillata	Eigenproduktion
Xylol (Isomere) > 98 %	Carl Roth
2-Propanol	Carl Roth
Citratpuffer, pH 6,0	Eigenproduktion
Leitungswasser	-
BSA, IgG-frei, >98 %	Carl Roth
TBS, pH 7,6	Eigenproduktion
Serumfreie Proteinblockierungsreagenz (Protein Block Serum-Free, Code X0909)	Dako
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth
Sekundärantikörper (Anti-Mouse/Rabbit IgG, biotinylated, Art.-Nr.: ZU114)	Nordic MUBio
Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Streptavidin/HRP, Code-Nr. P0397)	Dako
Mouse and Rabbit Specific HRP/AEC IHC Detection Kit – Micropolymer (ab236467), enthält unkonjugierte Kaninchenantikörper (Mouse Specifying Reagent) sowie Komplex aus Polymer, Sekundärantikörper und HRP	Abcam
AEC-Lösung (AEC+ Substrate-Chromogen, Code K3469)	Dako
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth
Eindeckmittel Aquatex®	Merck

3. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik

Alle Augen und deren okuläre Strukturen, die immunhistochemisch untersucht wurden, zeigten eine Farbreaktion. Der Mittelwert des Farbscores für alle Färbungen, unabhängig vom verwendeten Antikörper, lag bei $7,70 \pm 3,22$, der Median bei 7,50. Die Mittelwerte bei den Färbungen, die sich für die Antikörper Anti-H3Ac ($8,93 \pm 2,66$; Median 9,00) und Anti-5MeC ($8,47 \pm 2,85$; Median 9,00) ergaben, lagen oberhalb dieses Mittelwertes, die Mittelwerte der Färbungen mit den Antikörpern Anti-H4Ac ($7,57 \pm 3,41$, Median 7,50) und Anti-5hMeC ($5,81 \pm 2,99$, Median 5,50) unterhalb dieses Mittelwertes. Der höchste Mittelwert des Farbscores zeigte sich im Kammerwinkel bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac ($10,39 \pm 2,22$), der niedrigste Wert in der peripheren ONL bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC ($4,70 \pm 2,95$) (Tab. 5).

Tab. 5: Mittelwert der immunhistochemischen Färbung für die verschiedenen okulären Strukturen. ONL: Äußere Körnerschicht. INL: Innere Körnerschicht. GCL: Ganglienzellschicht

Okuläre Struktur	Lokalisation	Anti-H3Ac	Anti-H4Ac	Anti-5MeC	Anti-5hMeC
Kornea		$9,5 \pm 2,59$	$9,14 \pm 3,05$	$9,2 \pm 9,2$	$5,85 \pm 5,85$
Kammerwinkel		$10,39 \pm 2,22$	$10,06 \pm 2,87$	$9,56 \pm 2,73$	$6,94 \pm 3,47$
Aderhaut		$9,5 \pm 2,53$	$8,99 \pm 2,6$	$8,49 \pm 2,59$	$5,06 \pm 2,62$
Retina zentral	ONL	$9,27 \pm 3,23$	$8,11 \pm 3,76$	$8,56 \pm 3,49$	$5,25 \pm 3,55$
	INL	$8,48 \pm 2,15$	$6,59 \pm 2,48$	$8,27 \pm 2,45$	$5,48 \pm 2,34$
	GCL	$8,89 \pm 2,71$	$5,85 \pm 3,31$	$8,02 \pm 2,86$	$6,67 \pm 2,85$
Retina peripher	ONL	$8,27 \pm 2,82$	$7,68 \pm 3,32$	$7,93 \pm 3,14$	$4,7 \pm 2,95$
	INL	$8,04 \pm 2,27$	$6,38 \pm 2,99$	$7,94 \pm 2,74$	$5,65 \pm 2,44$
	GCL	$8,03 \pm 2,59$	$5,07 \pm 3,06$	$8,3 \pm 2,8$	$6,81 \pm 2,93$

3.2 Korrelation Alter und Farbscore

Die Untersuchung der Korrelation des Farbscores mit dem Gestationsalter ergab, unter Berücksichtigung aller Antikörper, eine Abnahme des Farbscores mit zunehmendem Gestationsalter ($p < 0,01$; Pearson-Korrelation $r = -0,24$). Die Analyse der einzelnen

Antikörper (Tab. 6) zeigte die stärkste Korrelation bei dem Antikörper Anti-5hMeC ($r = -0,40$) und die niedrigste Korrelation bei Anti-H4Ac ($r = -0,18$).

Tab. 6: Pearson-Korrelation von Alter und Farbscore bei Zusammenfassung aller okulären Strukturen

Antikörper	Korrelationskoeffizient [r]	Signifikanz [p]
Anti-H3Ac	-0,19	< 0,01
Anti-H4Ac	-0,18	< 0,01
Anti-5MeC	-0,26	< 0,01
Anti-5hMeC	-0,40	< 0,01

Bei der Analyse der Korrelation von Farbscore und Gestationsalter der einzelnen untersuchten okulären Strukturen zeigte sich bei allen Antikörper-Färbungen eine Abnahme des Farbscores mit zunehmendem Alter (Tab. 7). Dies gilt auch für die einzelnen retinalen Schichten (ONL, INL, GCL).

Tab. 7: Pearson-Korrelation von Gestationsalter und Farbscore für jeden Antikörper in Abhängigkeit der okulären Struktur. Korrelationen mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ sind fett markiert. ONL: Äußere Körnerschicht. INL: Innere Körnerschicht. GCL: Ganglienzellschicht. r: Korrelationskoeffizient

Okuläre Struktur	Lokalisation	Anti-H3Ac [r]	Anti-H4Ac [r]	Anti-5MeC [r]	Anti-5hMeC [r]
Kornea		-0,007	-0,076	-0,292	-0,460
Kammerwinkel		-0,454	-0,548	-0,589	-0,600
Aderhaut		-0,174	-0,389	-0,364	-0,562
Retina gesamt		-0,190	-0,127	-0,188	-0,328
Retina zentral		-0,189	-0,091	-0,233	-0,358
	ONL	-0,229	-0,294	-0,329	-0,480
	INL	-0,195	-0,168	-0,203	-0,323
	GCL	-0,150	-0,184	-0,152	-0,274
Retina peripher		-0,199	-0,164	-0,144	-0,297
	ONL	-0,120	-0,242	-0,144	-0,379
	INL	-0,235	-0,301	-0,078	-0,187
	GCL	-0,261	-0,135	-0,237	-0,431

3.2.1 Korrelation Alter und Farbscore in der Kornea

Innerhalb der Kornea zeigte sich eine gleichförmige Anfärbung der Zellkerne von Epithelzellen, stromalen Keratozyten und Endothelzellen ohne abgrenzbare Differenzen zwischen diesen Zellpopulationen. Die Analyse des Farbscores ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Altersstufen (Abb. 12 und 13). Auch die deutlich geringere Färbung im dritten Trimester bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC war nicht statistisch signifikant ($p = 0,075$).

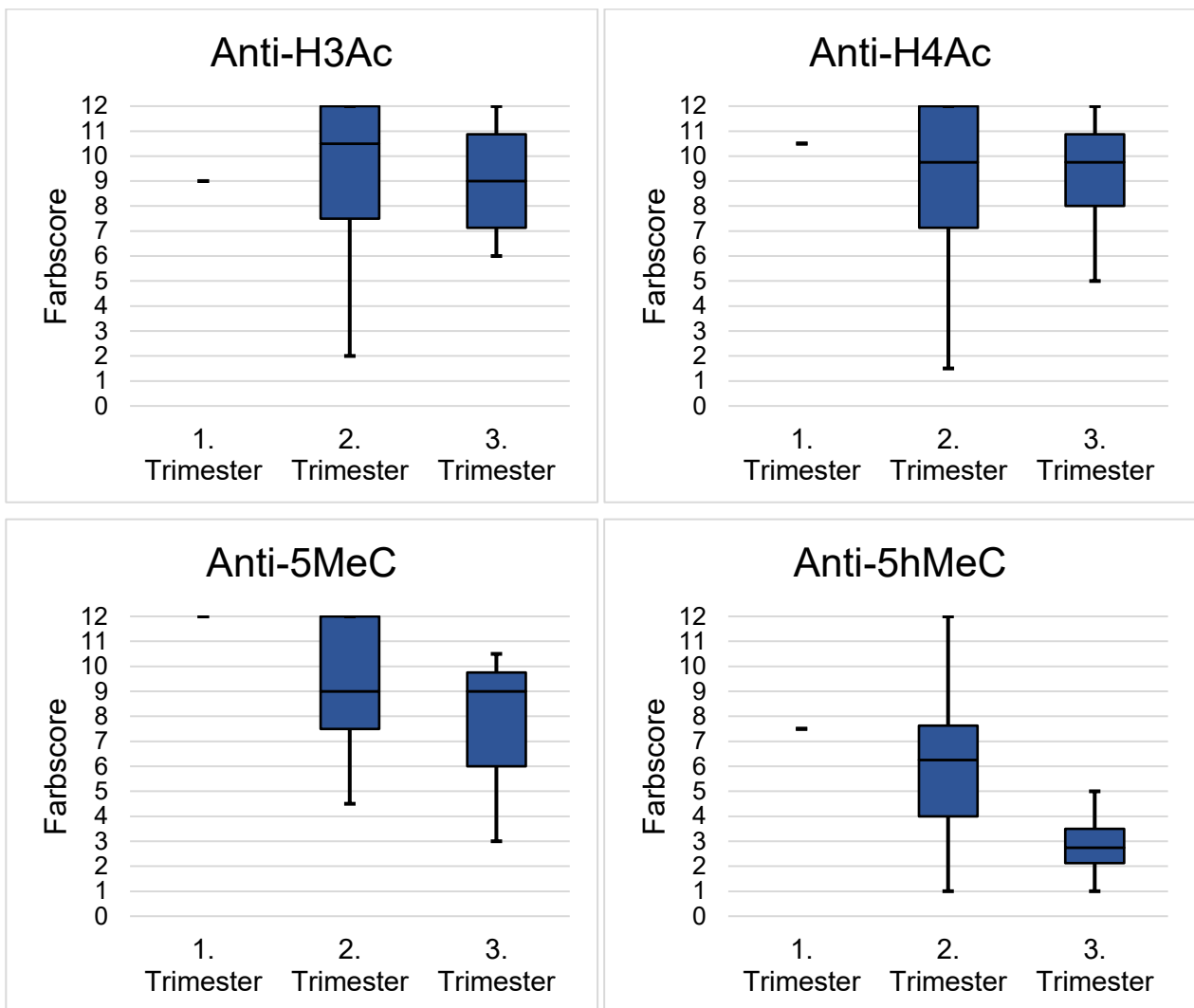


Abb. 12: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der Kornea, dargestellt als Boxplots. Für das erste Trimester stand nur ein Präparat zur Verfügung. Im dritten Trimester zeigte sich bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC die größte Differenz zum zweiten Trimester, während die Unterschiede bei den übrigen Antikörpern geringer ausfielen

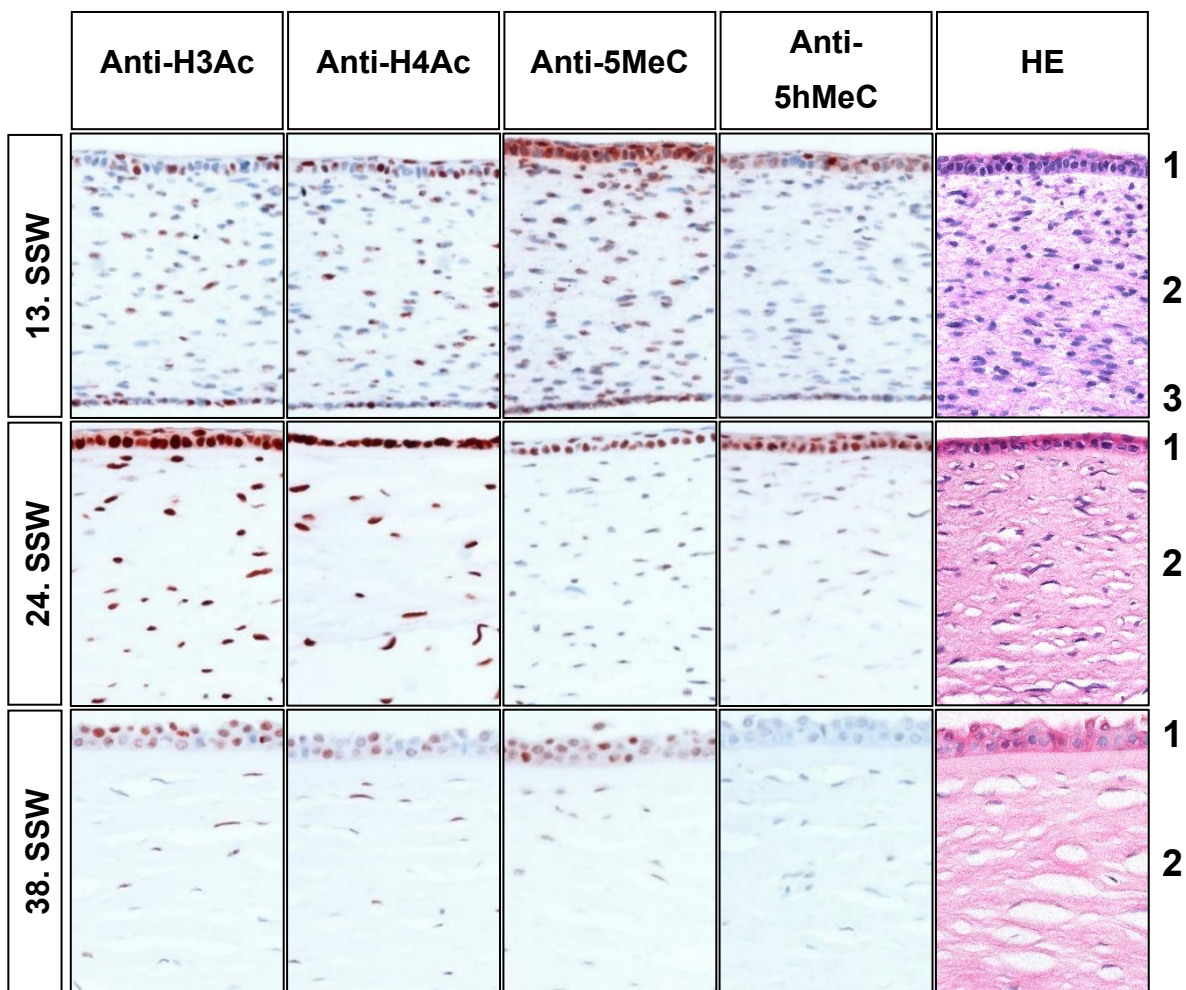


Abb. 13: Exemplarische Darstellung der Färbung der Kornea sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 400fache Vergrößerung. 1: Epithel. 2: Stroma. 3: Endothel

3.2.2 Korrelation Alter und Farbscore im Kammerwinkel

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen ($p = 0,008$ (Anti-H3Ac), $p = 0,013$ (Anti-H4Ac), $p = 0,013$ (Anti-5MeC), $p = 0,016$ (Anti-5hMeC); Kruskal-Wallis-Test, Abb. 14 und 15). Dabei waren Augen aus dem 2. Trimester signifikant stärker gefärbt als Augen aus dem 3. Trimester ($p = 0,004$ (Anti-H3Ac), $p = 0,014$ (Anti-H4Ac), $p = 0,019$ (Anti-5MeC), $p = 0,022$ (Anti-5hMeC); Mann-Whitney-U-Test).

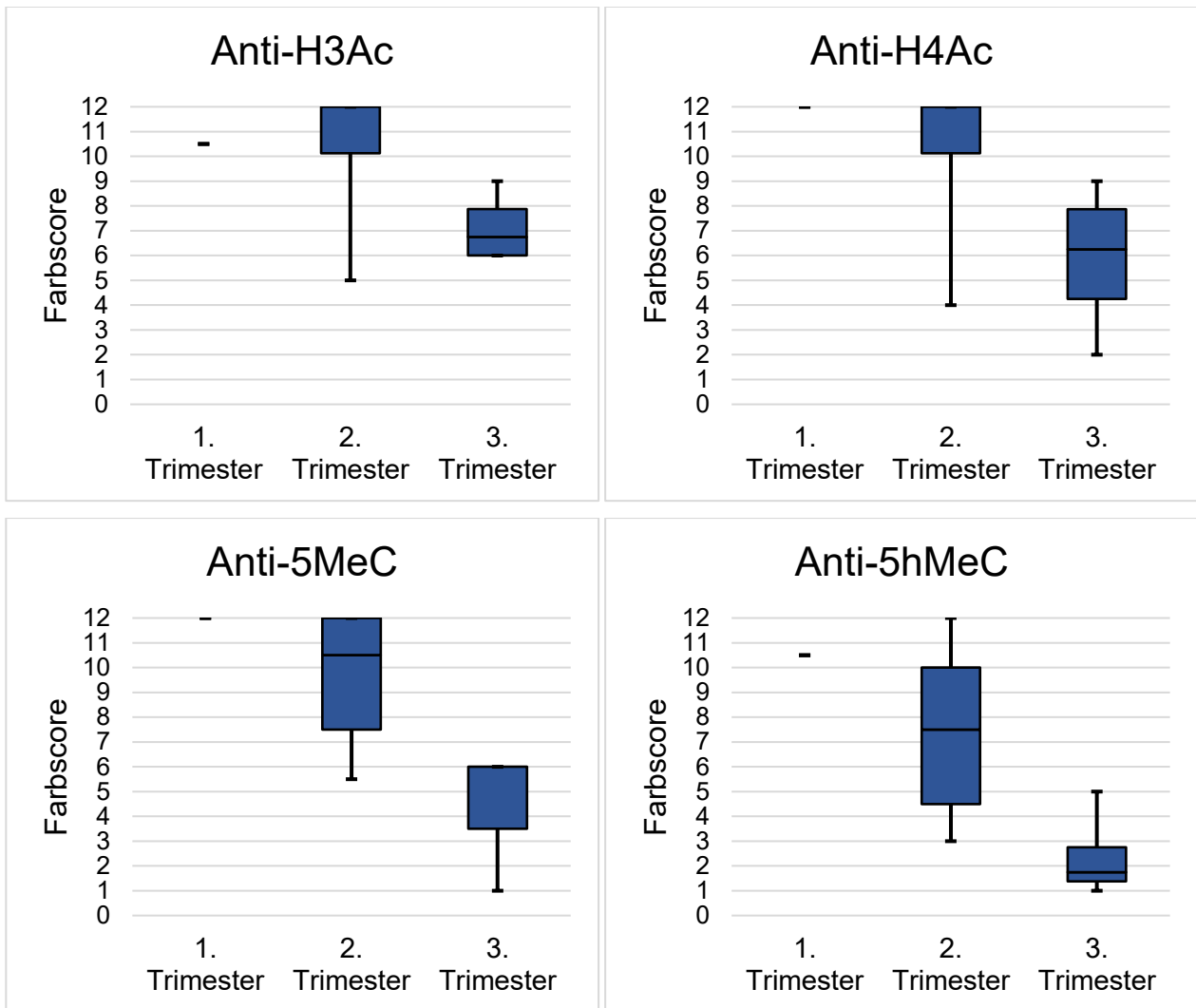


Abb. 14: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore im Kammerwinkel, dargestellt als Boxplots. Für das erste Trimester stand lediglich ein Präparat zur Auswertung zur Verfügung. Augen aus dem zweiten Trimester wiesen eine stärkere Färbung auf als Augen aus dem dritten Trimester

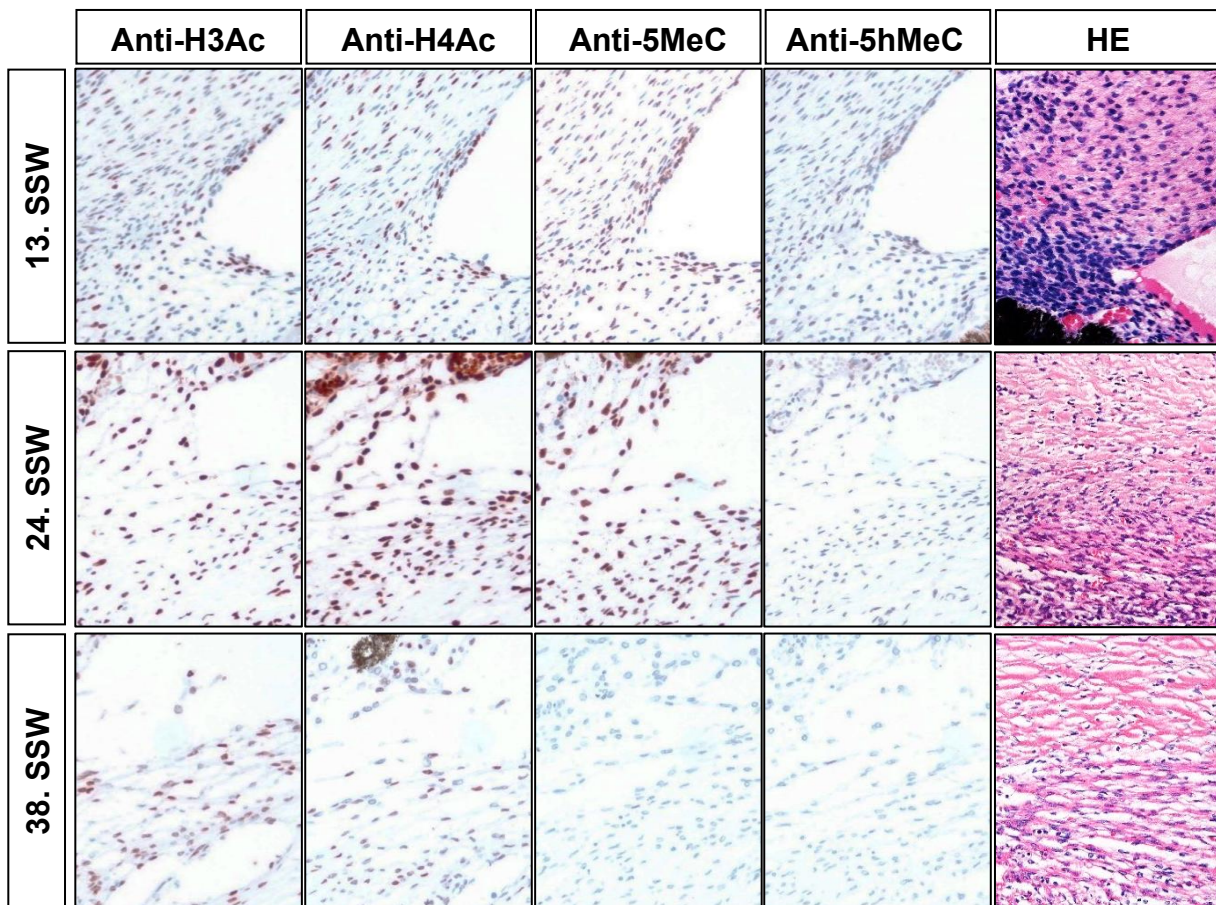


Abb. 15: Exemplarische Darstellung der Färbung des Kammerwinkels sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 200fache Vergrößerung

3.2.3 Korrelation Alter und Farbscore in der Aderhaut

Es ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen nachweisen ($p = 0,019$ (Anti-H3Ac), $p = 0,036$ (Anti-H4Ac), $p = 0,045$ (Anti-5MeC), $p = 0,026$ (Anti-5hMeC), Abb. 16, 17). Bei den Färbungen mit den Antikörpern Anti-H3Ac ($p = 0,016$), Anti-5MeC ($p = 0,039$) und Anti-5hMeC ($p = 0,024$) waren Augen aus dem 2. Trimester signifikant stärker gefärbt als Augen aus dem 3. Trimester. Bei dem Antikörper Anti-H4Ac erwies sich die schwächere Färbung des 3. Trimesters gegenüber der des 2. Trimesters als nicht statistisch signifikant ($p = 0,074$).

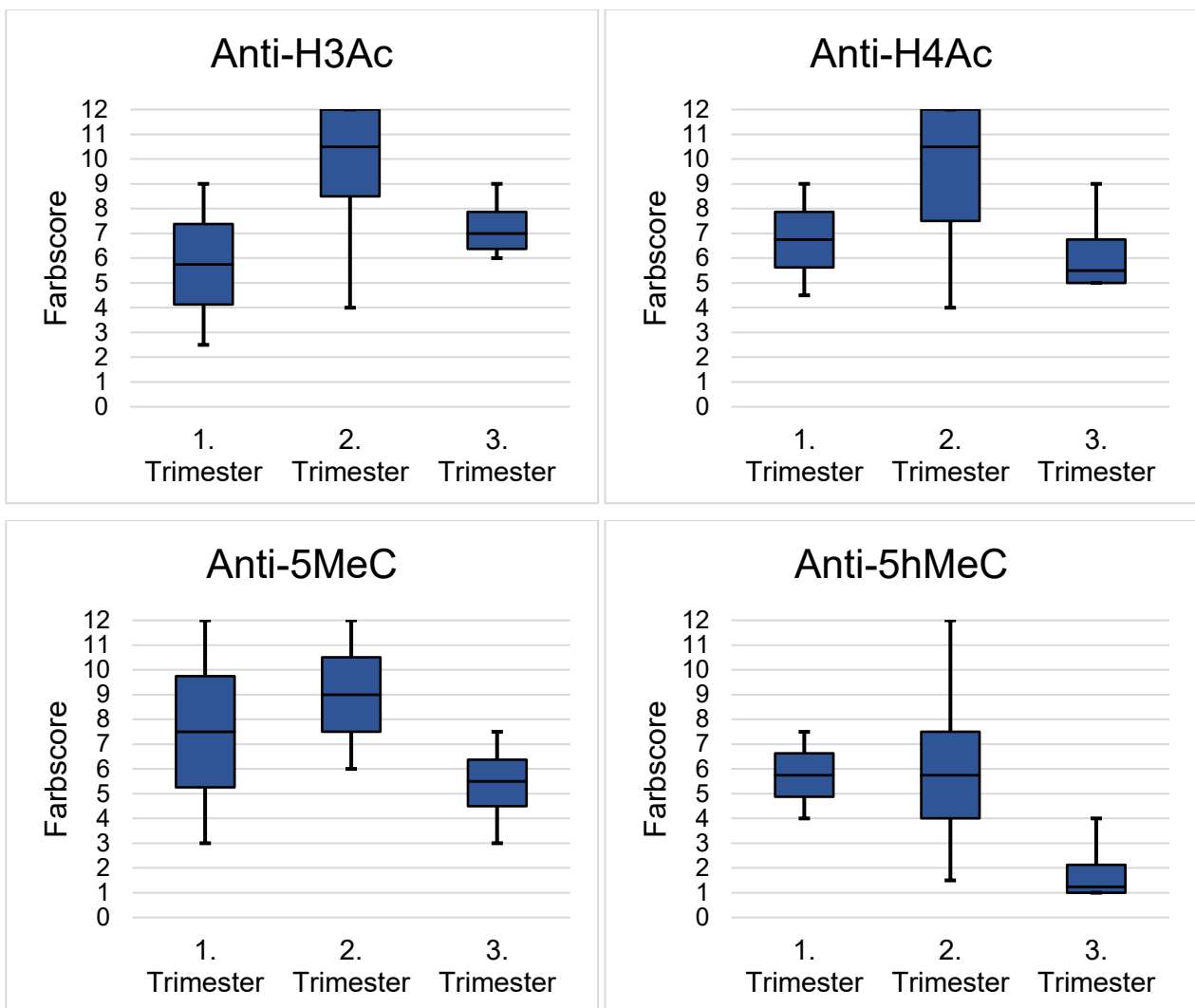


Abb. 16: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der Aderhaut, dargestellt als Boxplots. Augen aus dem dritten Trimester zeigten eine geringere Färbung als Augen aus dem zweiten Trimester

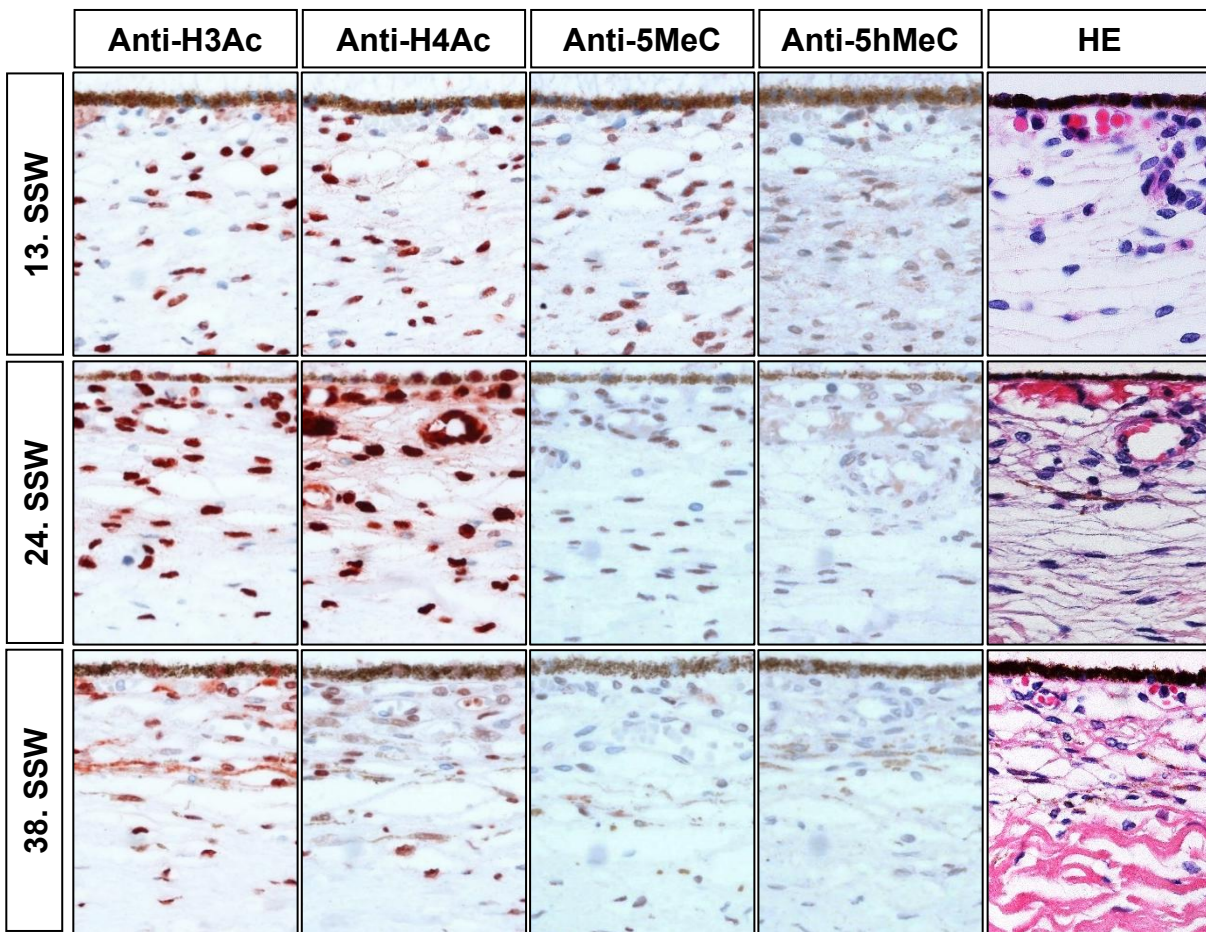


Abb. 17: Exemplarische Darstellung der Färbung der Aderhaut sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 400fache Vergrößerung

3.2.4 Korrelation Alter und Farbscore in der zentralen Retina

Für die Antikörper Anti-H3Ac ($p = 0,001$), Anti-5MeC ($p < 0,001$) und Anti-5hMeC ($p < 0,001$) ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen feststellen (Abb. 18). Bei diesen Antikörpern waren Augen aus dem 2. Trimester signifikant stärker gefärbt als Augen aus dem 3. Trimester ($p = 0,006$ (Anti-H3Ac), $p = 0,001$ (Anti-5MeC), $p = 0,002$ (Anti-5hMeC), bei den Antikörpern Anti-H3Ac ($p = 0,04$) und Anti-5MeC ($p = 0,004$) waren darüber hinaus Augen aus dem 1. Trimester signifikant schwächer gefärbt als Augen aus dem 2. Trimester.

Die separate Betrachtung der einzelnen Retinaschichten zeigte für den Antikörper Anti-5MeC einen signifikanten Unterschied zwischen den Altersstufen für die ONL ($p = 0,007$) und die INL ($p = 0,022$), sowie beim Antikörper Anti-5hMeC für die GCL ($p = 0,019$). In der ONL waren bei dem Antikörper Anti-5MeC Augen aus dem 2. Trimester signifikant stärker gefärbt als Augen aus dem 3. Trimester ($p = 0,023$).

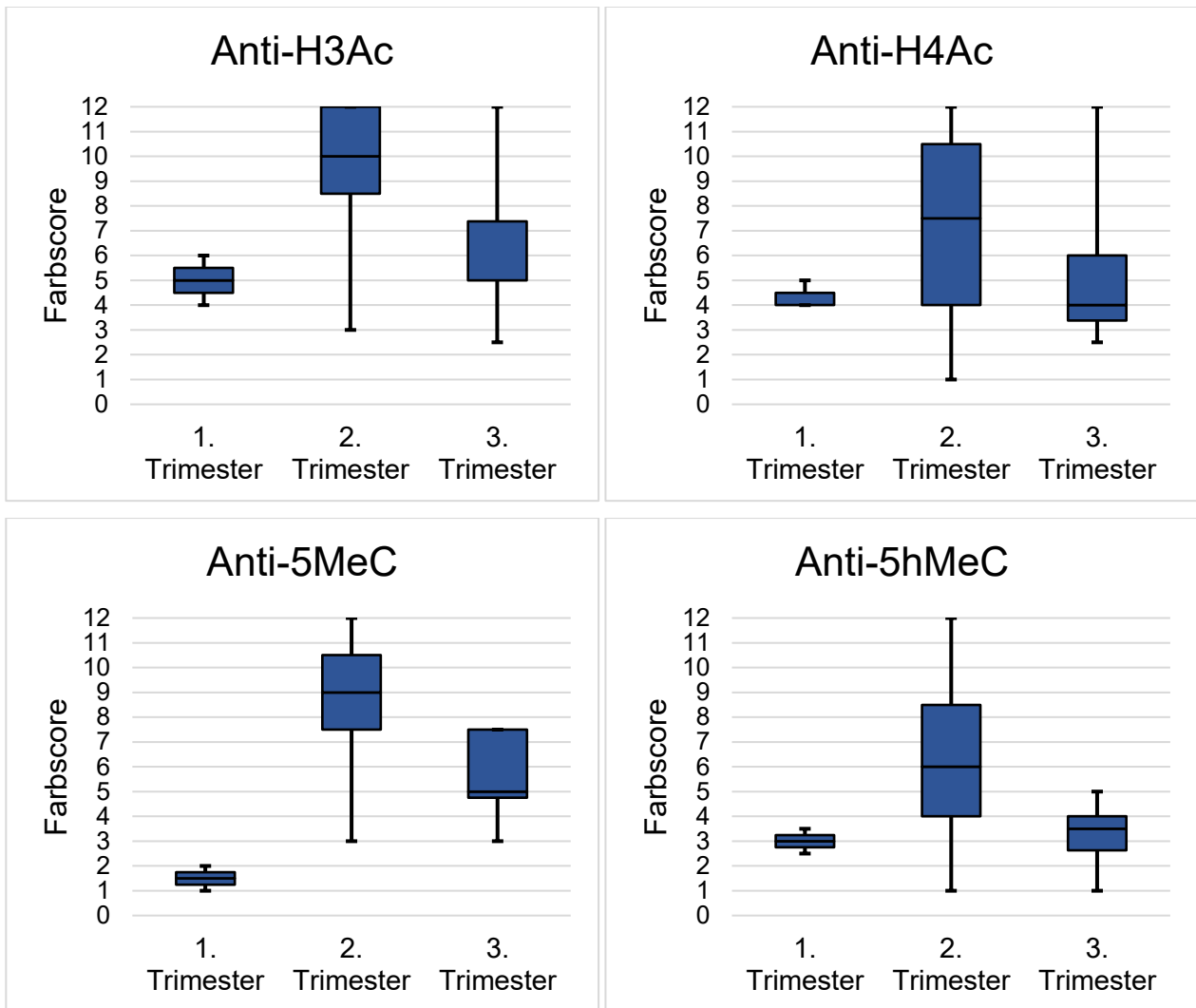


Abb. 18: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der zentralen Retina, dargestellt als Boxplots. Eine stärkere Färbung zeigte sich im zweiten Trimester im Vergleich zum ersten und dritten Trimester

3.2.5 Korrelation Alter und Farbscore in der peripheren Retina

Für die Antikörper Anti-H3Ac ($p = 0,002$), Anti-5MeC ($p = 0,015$), und Anti-5hMeC ($p = 0,009$) ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Altersgruppen feststellen (Abb. 19). Bei diesen Antikörpern war die Färbung in den Augen des 2. Trimesters entweder signifikant stärker als die in den Augen des 1. Trimesters (Anti-5MeC, $p = 0,016$), des 3. Trimesters (Anti-5hMeC, $p = 0,031$) oder signifikant stärker als die in den Augen beider Trimester (Anti-H3Ac, 1. vs. 2. Trimester: $p = 0,006$; 2. vs. 3. Trimester: $p = 0,012$).

Die separate Betrachtung der einzelnen Retinaschichten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Altersstufen für die ONL bei den Antikörpern Anti-H3Ac ($p = 0,024$)

und Anti-5hMeC ($p = 0,029$) sowie für die GCL bei dem Antikörper Anti-H4Ac ($p = 0,039$). In der ONL waren bei dem Antikörper Anti-5hMeC Augen aus dem 2. Trimester signifikant stärker gefärbt als Augen aus dem 3. Trimester ($p = 0,033$).

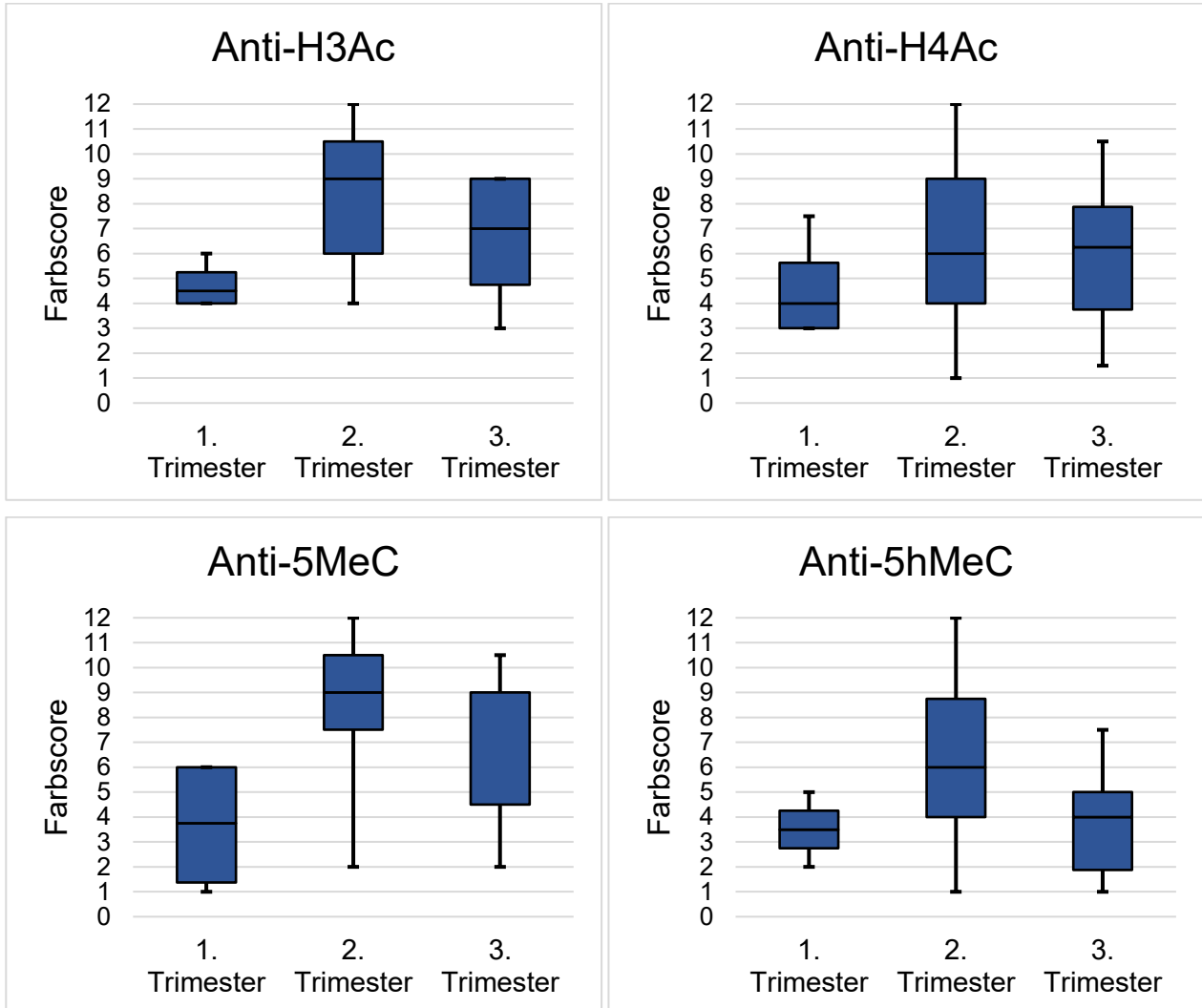


Abb. 19: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der peripheren Retina, dargestellt als Boxplots. Augen aus dem zweiten Trimester zeigten insgesamt eine stärkere Färbung als Augen aus dem ersten oder dritten Trimester

3.3 Korrelation zwischen den epigenetischen Modifikationen

Der Zusammenhang des Farbscores der verschiedenen Antikörper zueinander wurde untersucht, indem die Korrelation nach Pearson berechnet wurde. Dazu wurden alle untersuchten Strukturen mit einbezogen und die Beziehung des Farbscores zueinander zwischen allen Antikörper-Färbungen verglichen. Zwischen jedem Antikörper-Paar war eine positive Korrelation vorhanden (Tab. 8). Die stärkste Korrelation ließ sich zwischen den Antikörpern Anti-H3Ac und Anti-H4Ac ($r = 0,78$) nachweisen, die niedrigste Korrelation

zwischen Anti-H4Ac und Anti-5hMeC ($r = 0,33$, Abb. 20). Die Werte waren in allen Fällen statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Tab. 8: Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen Antikörpern, bezogen auf alle okulären Strukturen

	Anti-H3Ac	Anti-H4Ac	Anti-5MeC	Anti-5hMeC
Anti-H3Ac	1	0,78	0,64	0,49
Anti-H4Ac	0,78	1	0,52	0,33
Anti-5MeC	0,64	0,52	1	0,63
Anti-5hMeC	0,49	0,33	0,63	1

Zur weiteren Differenzierung wurde zudem, einzeln für jede untersuchte okuläre Struktur, die Korrelation zwischen allen Antikörpern bestimmt. Dabei zeigte sich in allen Fällen eine positive Korrelation (Tab. 9). Die höchste Korrelation mit $r = 0,892$ zeigte sich zwischen Anti-H3Ac und Anti-H4Ac in der ONL der peripheren Retina, die niedrigste Korrelation mit $r = 0,095$ zwischen Anti-H4Ac und Anti-5hMeC in der GCL der zentralen Retina. Ein statistisch signifikantes Ergebnis lag in 63 der 72 Fälle vor. In acht von neun Fällen, in denen keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte, handelte es sich um die INL oder die GCL der Retina.

Tab. 9: Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen Antikörpern, bezogen auf die einzelnen okulären Strukturen. Korrelationen mit einer Signifikanz von $p < 0,05$ sind fett markiert. ONL: Äußere Körnerschicht. INL: Innere Körnerschicht. GCL: Ganglienzellschicht. r: Korrelationskoeffizient

Okuläre Struktur	Anti-H3Ac/H4Ac [r]	Anti-H3Ac/5MeC [r]	Anti-H3Ac/5hMeC [r]	Anti-H4Ac/5MeC [r]	Anti-H4Ac/5hMeC [r]	Anti-5MeC/5hMeC [r]
Kornea	0,862	0,681	0,449	0,711	0,529	0,535
Kammerwinkel	0,854	0,696	0,693	0,815	0,693	0,774
Aderhaut	0,849	0,641	0,549	0,678	0,644	0,575
Retina gesamt	0,729	0,609	0,452	0,411	0,214	0,631
Retina zentral	0,738	0,641	0,460	0,396	0,226	0,654
- ONL	0,807	0,736	0,494	0,526	0,486	0,721
- INL	0,737	0,558	0,362	0,251	0,137	0,623
- GCL	0,676	0,588	0,528	0,297	0,095	0,676
Retina peripher	0,720	0,574	0,448	0,423	0,200	0,606
- ONL	0,892	0,663	0,526	0,559	0,510	0,649
- INL	0,751	0,425	0,320	0,515	0,250	0,558
- GCL	0,557	0,607	0,531	0,282	0,147	0,640

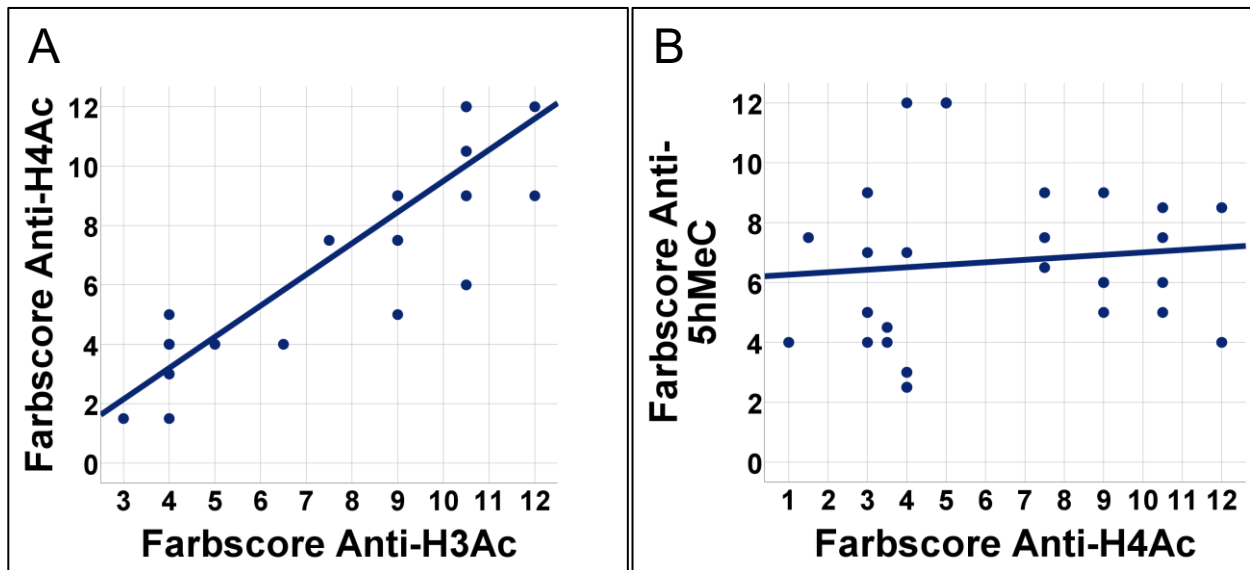


Abb. 20: Darstellung der höchsten und niedrigsten Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen epigenetischen Markern. A: Korrelation zwischen Anti-H3Ac und Anti-H4Ac in der ONL der peripheren Retina. B: Korrelation zwischen Anti-H4Ac und Anti-5hMeC in der GCL der zentralen Retina

3.4 Korrelation zwischen zentraler und peripherer Retina

Beim Vergleich der Netzhautschichten zwischen zentraler und peripherer Retina zeigte sich eine hohe positive Korrelation des Farbscores zwischen den einzelnen Schichten. Unter Berücksichtigung aller Antikörper sowie aller retinalen Zellschichten ergab sich eine Korrelation von $r = 0,793$ ($p < 0,01$). Bei separater Analyse der einzelnen Zellschichten ergab sich für die ONL die größte Korrelation ($r = 0,816$), darauf folgten die INL ($r = 0,793$) und die GCL ($r = 0,770$). In allen Fällen waren die Werte statistisch signifikant ($p < 0,01$). Unter Berücksichtigung der einzelnen Antikörper ergab sich ebenfalls in jedem Fall eine positive Korrelation des Farbscores (Tab. 10). Die größte Korrelation zeigte sich für den Antikörper Anti-5MeC in der GCL ($r = 0,914$), die niedrigste Korrelation für Anti-H4Ac in der GCL ($r = 0,545$). Die Signifikanz betrug in allen Fällen $p < 0,01$.

Tab. 10: Korrelation des Farbscores zwischen zentraler und peripherer Retina. ONL: Äußere Körnerschicht. INL: Innere Körnerschicht. GCL: Ganglienzellschicht

Lokalisation	Antikörper	Korrelationskoeffizient [r]
Retina gesamt	Anti-H3Ac	0,714
	Anti-H4Ac	0,697
	Anti-5MeC	0,782
	Anti-5hMeC	0,877
ONL	Anti-H3Ac	0,750
	Anti-H4Ac	0,736
	Anti-5MeC	0,730
	Anti-5hMeC	0,912
INL	Anti-H3Ac	0,702
	Anti-H4Ac	0,727
	Anti-5MeC	0,766
	Anti-5hMeC	0,843
GCL	Anti-H3Ac	0,684
	Anti-H4Ac	0,545
	Anti-5MeC	0,914
	Anti-5hMeC	0,860

3.5 Einfluss des Geschlechts auf den Farbscore

Die Untersuchung des Einflusses des Geschlechts auf den Farbscore mittels Eta-Quadrat (η^2) ergab, dass die Augen weiblicher Feten eine signifikant stärkere Färbung aufwiesen als diejenigen männlicher Feten (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der Mittelwerte sowie Eta-Quadrat-Werte von männlichen und weiblichen Feten

Antikörper	Mittelwert weiblich	Mittelwert männlich	Eta-Quadrat	Signifikanz [p]
Anti-H3Ac	9,49	8,40	0,04	< 0,01
Anti-H4Ac	8,24	6,91	0,04	< 0,01
Anti-5MeC	9,05	7,90	0,04	< 0,01
Anti-5hMeC	6,32	5,29	0,03	< 0,01

Bei Betrachtung des η^2 der einzelnen untersuchten okulären Strukturen zeigte sich nur in zwei Fällen ein statistisch signifikantes Ergebnis: bei Anti-H3Ac konnte lediglich in der peripheren Retina für die GCL ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden ($\eta^2 = 0,13$; $p < 0,05$). Ebenso ließ sich beim Antikörper Anti-5MeC für den Kammerwinkel ein statistisch signifikantes Ergebnis mit einem Wert von $\eta^2 = 0,12$ ($p < 0,05$) erzielen.

3.6 Vergleich mit der adulten Retina

Zum Vergleich der Färbungen der Antikörper Anti-H3Ac, Anti-H4Ac und Anti-5MeC zwischen fetaler und adulter Retina dienten elf adulte Augen. Es zeigten sich in diesen Präparaten keine Unterschiede der Färbeintensität zwischen den zentralen und peripheren Retina-Abschnitten. Der Farbscore lag bei allen Antikörpern auf einem hohen Niveau (Tab. 12). Der niedrigste Farbscore wurde in einem Präparat mit dem Antikörper Anti-H3Ac mit einem Wert von 6 vergeben, in den übrigen Strukturen nahm der Farbscore einen Wert von mindestens 9 an. In diesen Präparaten ließ sich erkennen, dass die Färbungen relativ intensiv waren, es jedoch keine bedeutenden Unterschiede zwischen den einzelnen Zelltypen gab.

Tab. 12: Verteilung des Farbscores in den adulten Augen in ONL, INL und GCL. In den Feldern der Tabelle wird angegeben, wie häufig die jeweiligen Punkte des Farbscores vergeben wurden

	Lokalisation								
	Äußere Körnerschicht			Innere Körnerschicht			Ganglienzellschicht		
Antikörper	Farbscore			Farbscore			Farbscore		
	12	9	6	12	9	6	12	9	6
Anti-H3Ac	8	2	1	10	1	0	6	5	0
Anti-H4Ac	10	1	0	11	0	0	11	0	0
Anti-5MeC	8	3	0	11	0	0	9	2	0

3.7 Morphologische Auswertung

Neben der statistischen Auswertung erfolgte die detaillierte Betrachtung der immunhistochemischen Färbungen in Bezug auf die retinalen Schichten und deren Zelltypen, da sich insbesondere in der inneren Körnerschicht entwicklungsstadienabhängig nur eine Gruppe von Zellkernen (beispielsweise die Zellkerne der Müllerzellen) anfärbte. Im Folgenden werden die Präparate in einen Zeitraum von je maximal zwei Wochen eingeteilt und das jeweilige Erscheinungsbild der Färbungen wird beschrieben.

3.7.1 Woche 11 und 12

In diesem Alter konnten die äußere und innere Neuroblastenschicht histologisch differenziert werden (Abb. 21, 22). Besonders in den zentralen Bereichen ließ sich beobachten, dass bereits einige Zellkerne der inneren Neuroblastenschicht eine runde Form besaßen und damit einen höheren Grad an Differenzierung anzeigten.

In den Färbungen mit allen Antikörpern zeigte sich, dass die innen liegenden Zellkerne der bereits differenzierteren Zellen mit einer runden Zellkernform stärker angefärbt waren als die länglichen oder ovalen Zellkerne der undifferenzierteren Zellen. In dieser Altersstufe lagen zwei Präparate zur Auswertung vor.

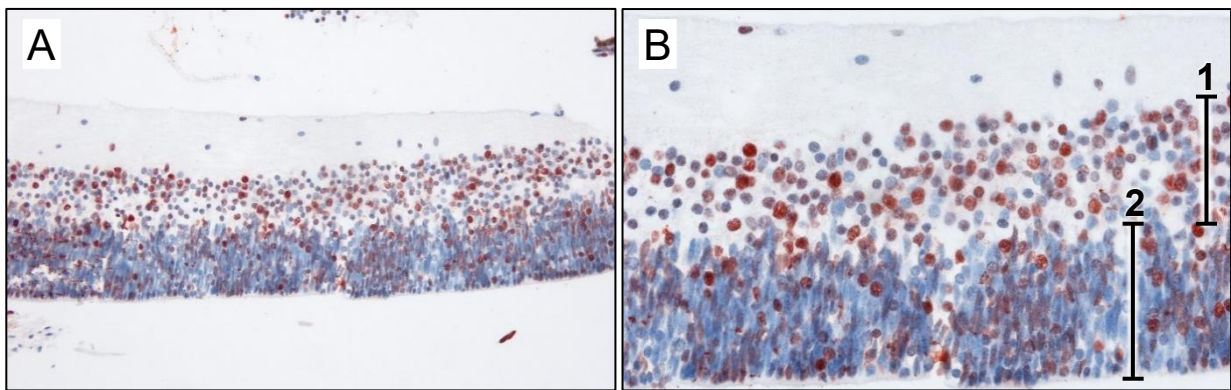


Abb. 21: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 12 SSW, zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung, B: 400fache Vergrößerung. 1: Innere Neuroblastenschicht. 2: Äußere Neuroblastenschicht

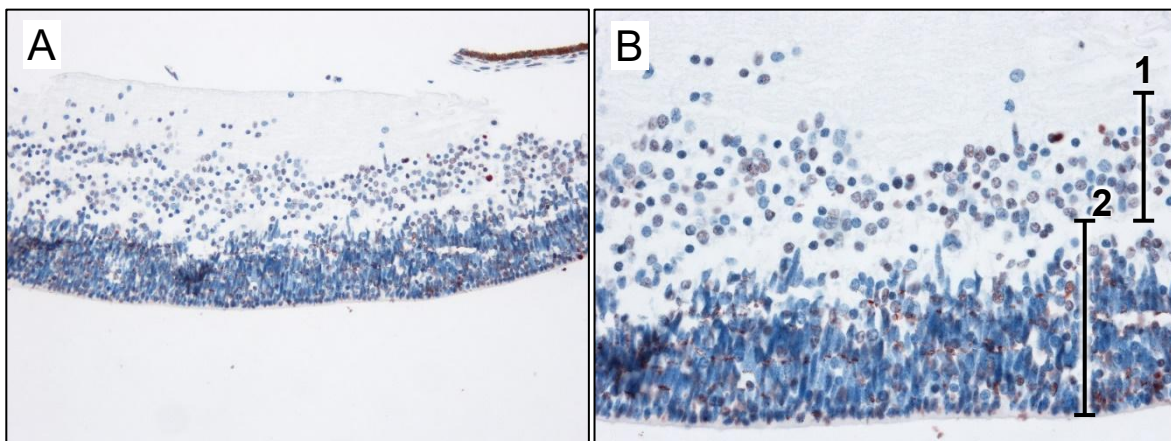


Abb. 22: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 12 SSW, zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung, B: 400fache Vergrößerung. 1: Innere Neuroblastenschicht. 2: Äußere Neuroblastenschicht

3.7.2 Woche 13 und 14

In dieser Altersstufe lagen fünf Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: Es ließen sich unterschiedliche Farbintensitäten der Zellkerne feststellen (Abb. 23). Allerdings zeigten sich auch in den Präparaten mit insgesamt nur schwacher oder mäßiger Farbintensität sowohl zentral als auch peripher diejenigen Zellkerne, die an die Außenseite der inneren plexiformen Schicht grenzten, stark gefärbt.

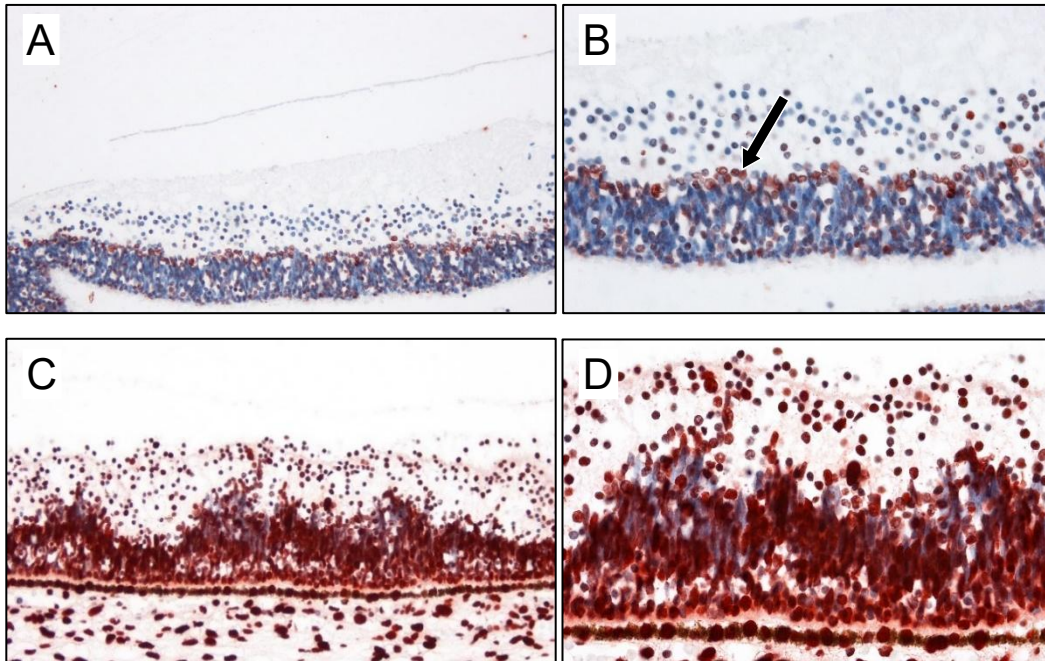


Abb. 23: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 13-14 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 13. SSW. C, D: periphere Retina, 14. SSW. Innen liegende Zellkerne der entstehenden INL deutlich gefärbt (Pfeil). A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

Anti-H4Ac: Ähnlich wie bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac zeigten sich in der INL die Zellkerne an der gleichen Position stark angefärbt, darüber hinaus auch noch die weiter außen liegenden Zellkerne (Abb. 24). Die Kerne der Müllerzellen zeigten dabei eine besonders intensive Färbereaktion. Die Ganglienzellen und amakrinen Zellen wiesen wesentlich weniger und schwächer gefärbte Zellkerne auf.

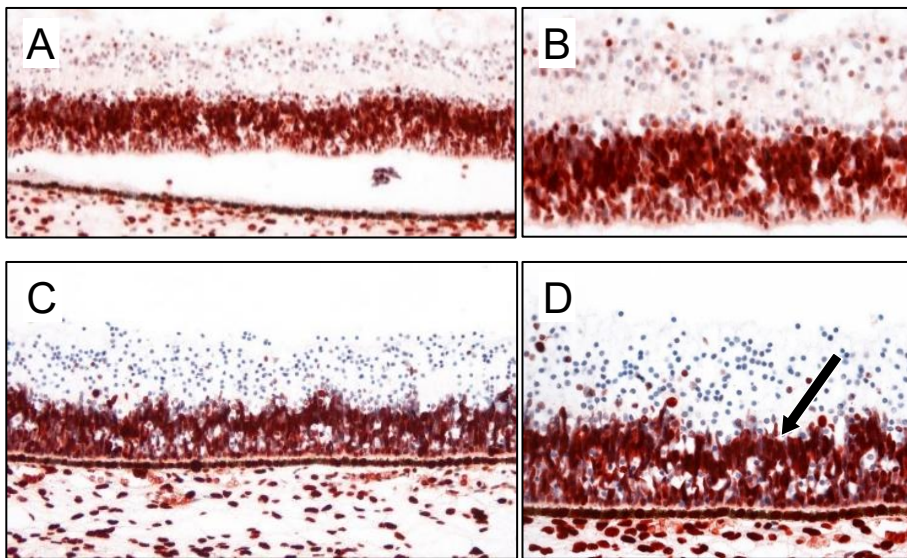


Abb. 24: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 13-14 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 13. SSW. C, D: periphere Retina, 14. SSW. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung. Die Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil) waren besonders intensiv gefärbt

Anti-5MeC: Es ließ sich eine inkonstante Farbintensität zwischen den Präparaten beobachten (Abb. 25). Gleichzeitig zeigten sich Präparate, in denen alle Zellkerne gefärbt waren neben Präparaten mit willkürlich erscheinendem Muster der angefärbten Zellkerne.

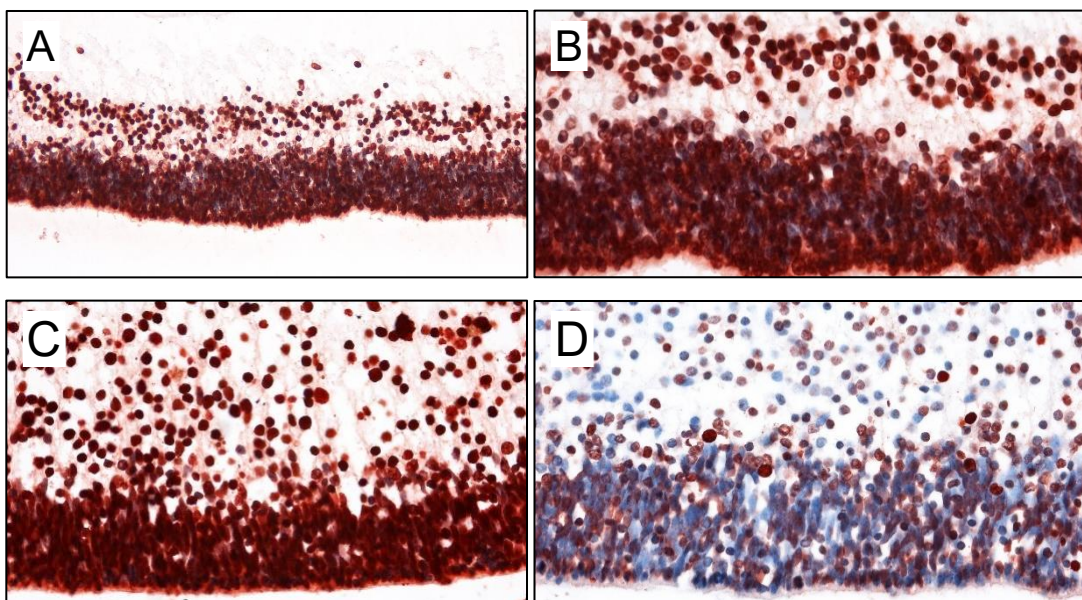


Abb. 25: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 13-14 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 14. SSW. C, D: periphere Retina, 14. SSW (C) bzw. 13. SSW (D). A: 200fache Vergrößerung, B-D: 400fache Vergrößerung

Anti-5hMeC: In der Peripherie ließen sich in den äußeren Schichten ovale Zellkerne beobachten, die eine schwächere Färbung aufwiesen als die runden Zellkerne (Abb. 26). Die Zellkerne der Ganglienzellen zeigten überwiegend eine stärkere Färbereaktion.

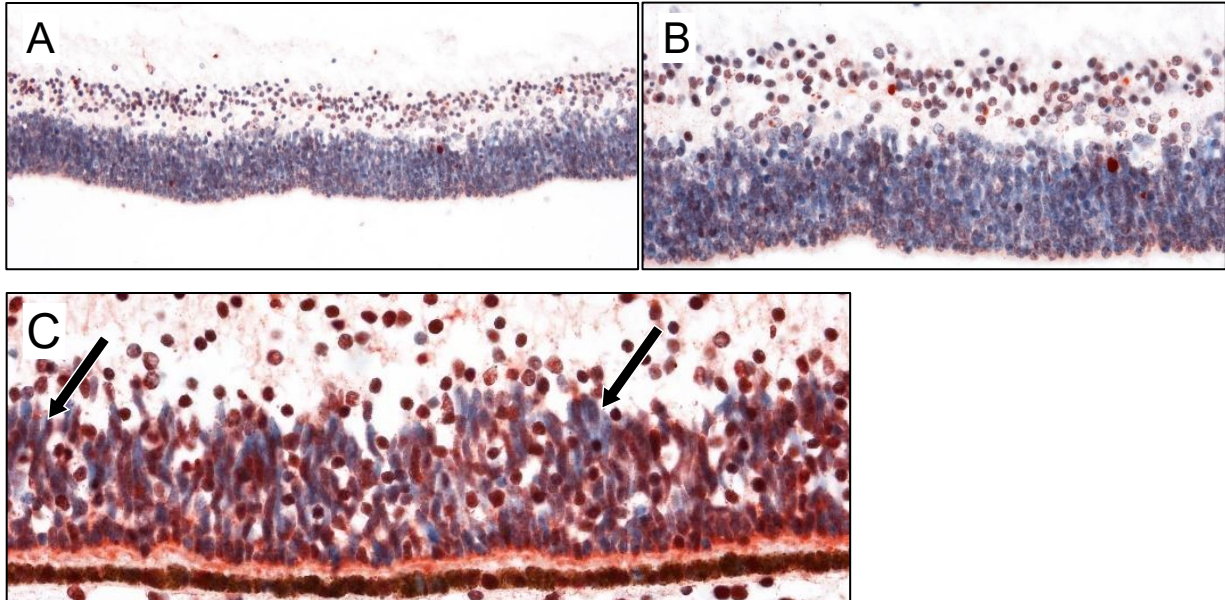


Abb. 26: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 14 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C: periphere Retina. Die Variabilität der Farbintensitäten lässt sich hier nachvollziehen. In der Peripherie fallen die ovalen Zellkerne mit schwacher Färbung auf (Pfeile) A: 200fache Vergrößerung. B, C: 400fache Vergrößerung

3.7.3 Woche 15 und 16

In diesem Zeitraum ließ sich die Ausbildung der äußeren plexiformen Schicht erkennen, damit wurde die Separierung von ONL und INL in der zentralen Retina sichtbar. Währenddessen zeigten sich die in diesem Zeitraum differenzierenden Horizontalzellen in der peripheren Retina als lose Reihe von runden Zellkernen, die an der Grenze zwischen INL und ONL lagen. Diese Zellen waren im betrachteten Zeitraum teilweise besonders stark angefärbt. In dieser Altersstufe lagen sechs Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: In der 15. SSW zeigte sich eine intensive Färbung der Zellkerne von Horizontalzellen, amakrinen Zellen und Ganglienzellen (Abb. 27). Die übrigen Zellkerne waren zum großen Teil angefärbt und wiesen eine moderate Stärke der Färbung auf. Während der 16. SSW zeigte sich in der Peripherie das identische Verhalten der Färbung wie in der 15. SSW, in den zentralen Retina-Abschnitten ließ sich jedoch erkennen, dass die Zellkerne amakriner Zellen und vereinzelter Ganglienzellen kaum gefärbt waren.

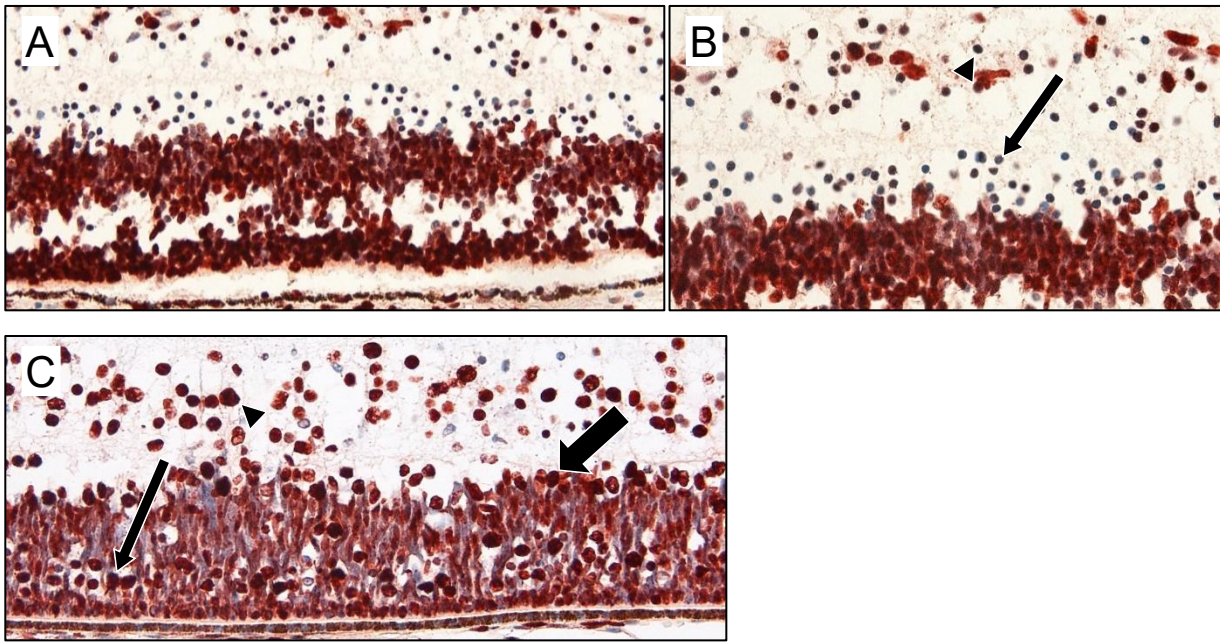


Abb. 27: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 15-16 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 16. SSW. C: periphere Retina, 15. SSW. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Zellkerne von amakrinen Zellen (Pfeil) und vereinzelter Ganglienzellen (Pfeilspitze). C: 200fache Vergrößerung. Starke Färbung der Zellkerne von Horizontalzellen (Pfeil), amakrinen Zellen (dicker Pfeil) und Ganglienzellen (Pfeilspitze)

Anti-H4Ac: Während der 15. SSW zeigten sich die gleichen Färbemuster wie bei der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac (Abb. 28). In der 16. SSW unterschieden sich die Färbungen dadurch, dass in den zentralen Abschnitten der Retina nicht nur die amakrinen Zellen, sondern zusätzlich auch die Zellen in der GCL schwach gefärbte Zellkerne aufwiesen.

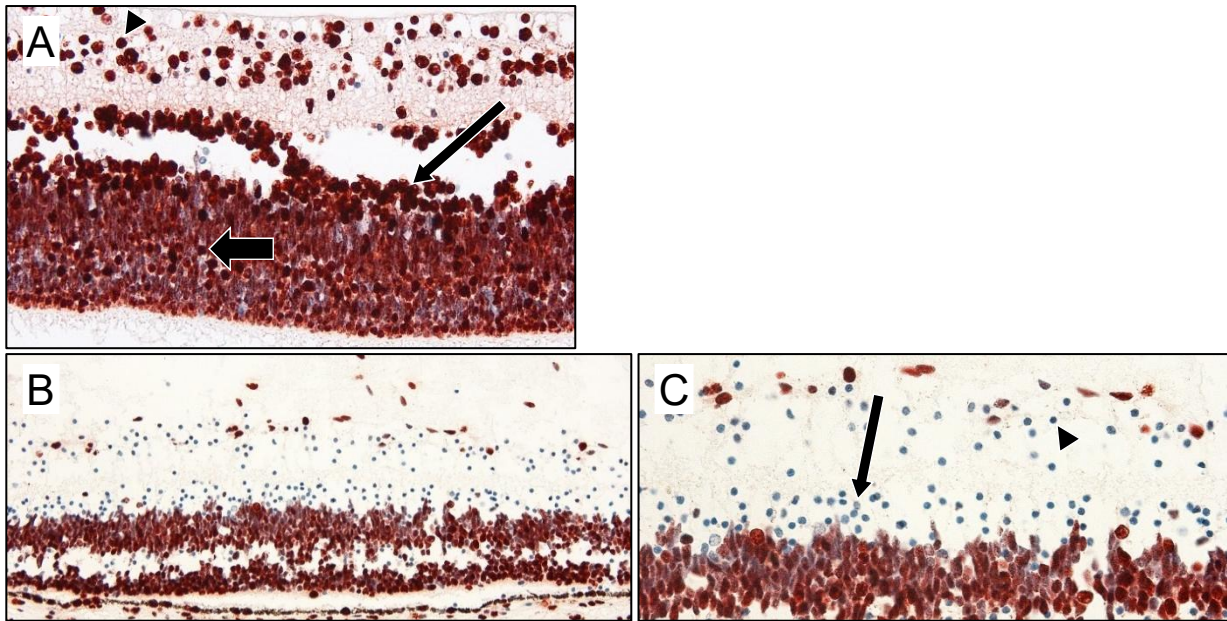


Abb. 28: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 15-16 SSW, Retina. A: zentrale Retina, 15. SSW. B, C: zentrale Retina, 16. SSW. A: 400fache Vergrößerung. Starke Färbung der Zellkerne von Horizontalzellen (dicker Pfeil), amakrinen Zellen (dünner Pfeil) und Ganglienzellen (Pfeilspitze). B: 200fache Vergrößerung. C: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Zellkerne von amakrinen Zellen (Pfeil) und Zellen der GCL (Pfeilspitze)

Anti-5MeC: In der 15. SSW zeigte die gesamte Retina ein eher diffuses Färbeverhalten (Abb. 29). Gleichzeitig ließen sich analog zu den Färbungen mit Anti-H3Ac und Anti-H4Ac die Horizontalzellen prominent anfärben. In der 16. SSW zeigte sich in der zentralen Retina ein ähnliches Verhalten wie bei dem Antikörper Anti-H4Ac: die Zellkerne der amakrinen Zellen und Ganglienzellen waren kaum, die übrigen Zellkerne dagegen stärker gefärbt.

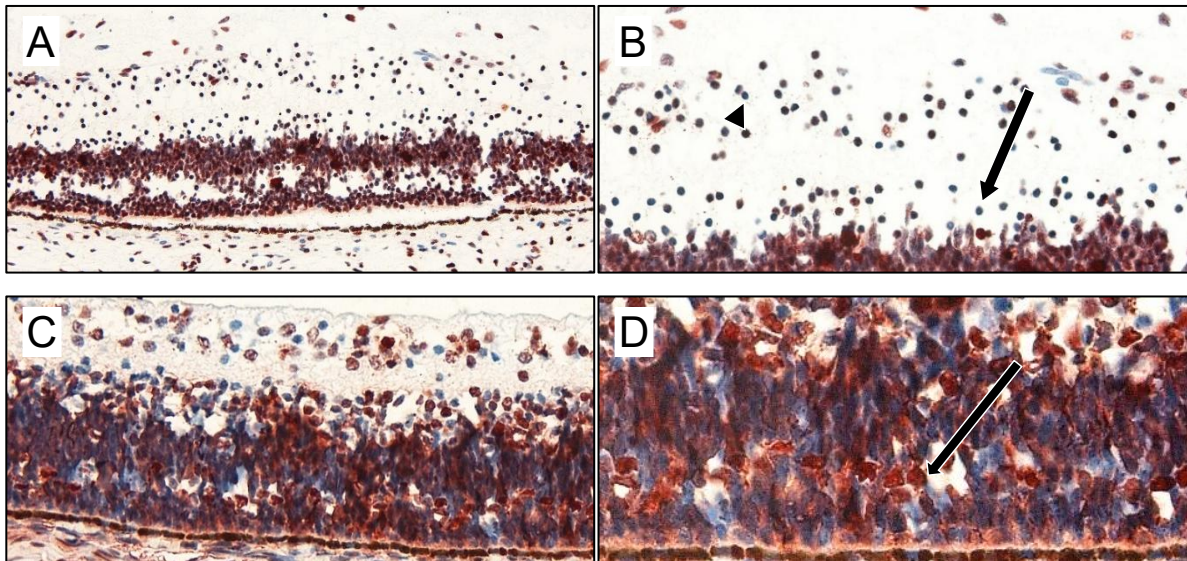


Abb. 29: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 15-16 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 16. SSW. C, D: periphere Retina, 15. SSW. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Zellkerne von amakrinen Zellen (Pfeil) und Ganglienzellen (Pfeilspitze). D: 400fache Vergrößerung. Die Horizontalzellen (Pfeil) sind stark angefärbt

Anti-5hMeC: Es ergab sich ein eher diffuses Bild der Färbung (Abb. 30). Es fanden sich in ähnlichem Maße gefärbte wie ungefärbte Zellkerne, deren Verteilung aber keine richtungsweisenden Anhaltspunkte auf eine Zell- oder Schichtzugehörigkeit lieferte.

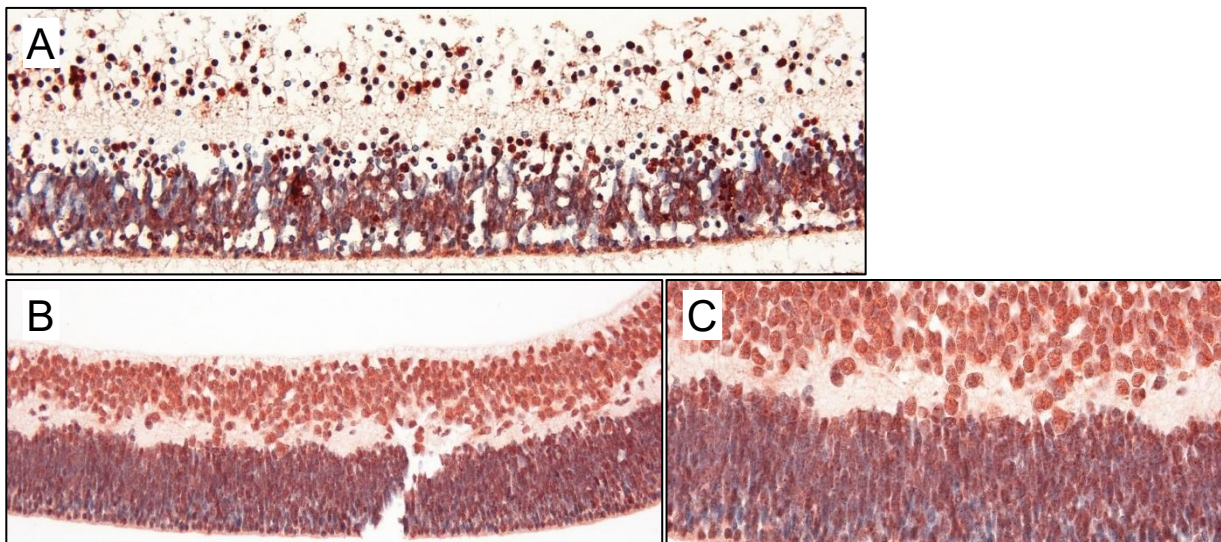


Abb. 30: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 15-16 SSW, Retina. A: zentrale Retina, 16. SSW. B, C: periphere Retina, 15. SSW. A, B: 200fache Vergrößerung. C: 400fache Vergrößerung

3.7.4 Woche 17 und 18

Bei den Präparaten dieser Altersgruppe ließ sich in allen Abschnitten der Retina die Trennung zwischen GCL und INL erkennen. In dieser Altersstufe lagen vier Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: In den zentralen Bereichen der Retina zeigten insbesondere die Kerne der INL und ONL eine intensive Anfärbung, mit Ausnahme der amakrinen Zellen (Abb. 31). Die Ganglienzellen und amakrinen Zellen stellten sich im zentralen Bereich in dieser Altersgruppe inhomogen dar, es fanden sich sowohl Präparate mit starker als auch schwacher Kernfärbung. Im einzelnen Präparat wiesen die Zellkerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen allerdings konstant einen übereinstimmenden Grad der Farbintensität auf. Während zentral die Färbung der Kerne von Ganglienzellen und amakrinen Zellen teilweise schwach ausfiel, waren diese Zelltypen in der Peripherie permanent stärker angefärbt. Die anderen Zelltypen präsentierten sich ähnlich wie im zentralen Bereich mit einer intensiven Anfärbung der Zellkerne.

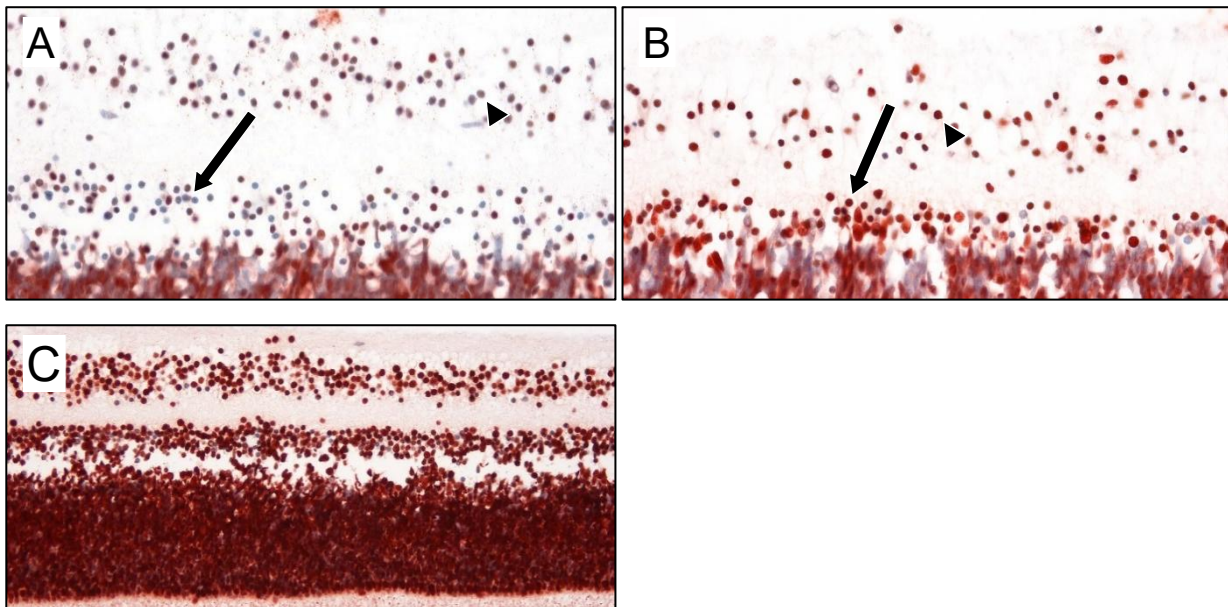


Abb. 31: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 18 SSW, Retina. A, C: zentrale Retina. B: periphere Retina. A: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Kerne von Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrinen Zellen (Pfeil). B: 400fache Vergrößerung. Starke Färbung der Kerne von Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrinen Zellen (Pfeil). C: 200fache Vergrößerung

Anti-H4Ac: Sowohl zentral als auch peripher waren die Kerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen durchgehend in geringem Ausmaß gefärbt (Abb. 32). Besonders in der zentralen Retina fielen stark gefärbte Zellkerne in der INL auf, die sich den Müllerzellen zuordnen ließen. Die übrigen Zellkerne der INL und ONL waren im zentralen Bereich mäßig bis schwach gefärbt. In der Peripherie waren zusätzlich zu den Müllerzellen der Großteil der weiteren Zellkerne stark angefärbt. Im Gegensatz zu den anderen Präparaten fiel ein Präparat aus diesem Alterszeitraum mit einer besonders starken Färbung aller Zelltypen auf.

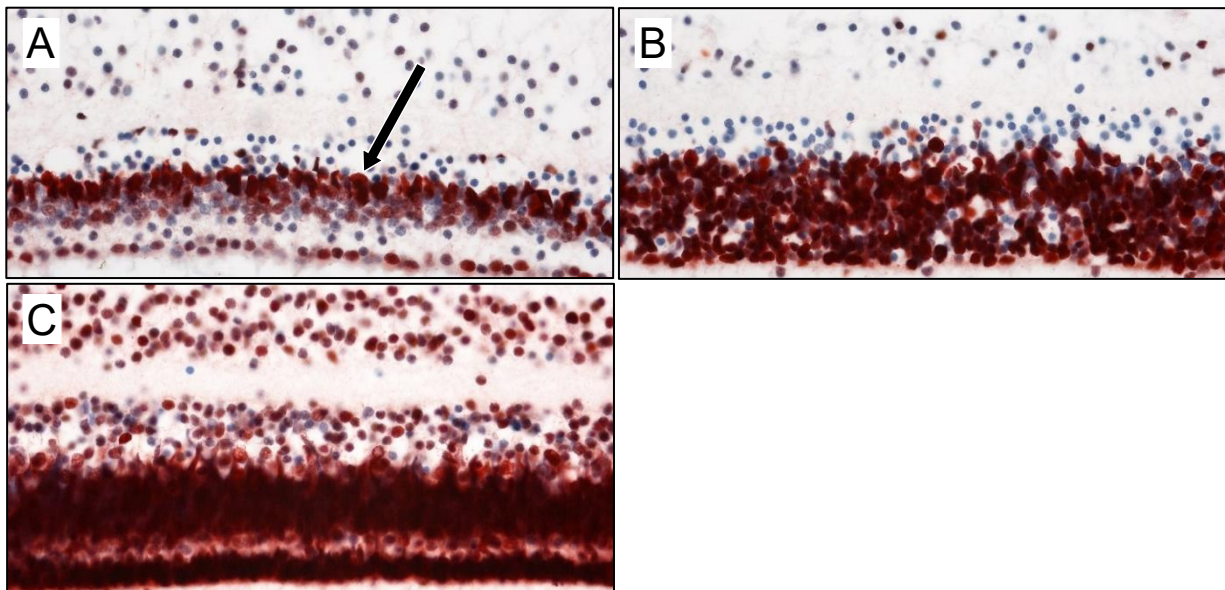


Abb. 32: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 17-18 SSW, Retina. A: zentrale Retina, 17. SSW. B: periphere Retina, 17. SSW. C: zentrale Retina, 18. SSW. A: 400fache Vergrößerung. Intensive Färbung der Kerne der Müllerzellen (Pfeil) und der Photorezeptorzellkerne. B: 400fache Vergrößerung. Intensive Färbung der Kerne der Müllerzellen und weiterer Zellkerne der INL und ONL. C: 400fache Vergrößerung. Intensive Anfärbung im gesamten Präparat

Anti-5MeC: Im zentralen Bereich der Retina zeigte sich eine starke Anfärbung aller Zellkerne, lediglich unter den amakrinen Zellen fanden sich häufiger schwächer angefärbte Zellkerne (Abb. 33). In der Peripherie setzte sich dieses Bild fort, lediglich die Kerne der Photorezeptorzellen präsentierten sich mit einer weniger intensiven Färbung.

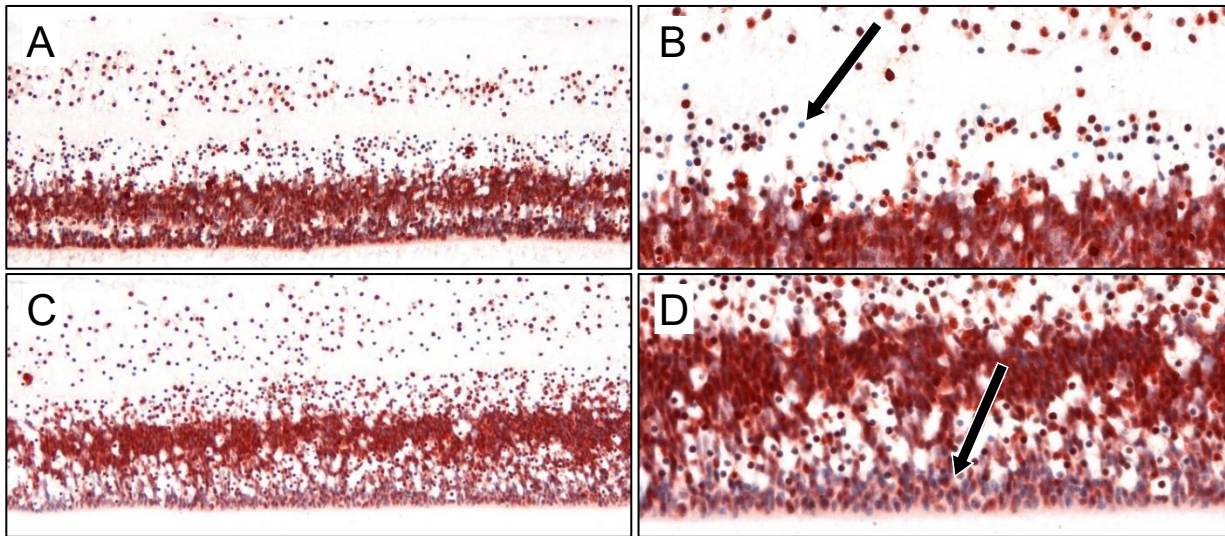


Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 18 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Leicht schwächere Anfärbung der Zellkerne von amakrinen Zellen (Pfeil). D: 400fache Vergrößerung. Kerne der Photorezeptoren (Pfeil) mit schwächerer Färbung als zentral

Anti-5hMeC: Die Verteilung der angefärbten Zellkerne schwankte stark zwischen den Präparaten und die Färbungen zeichneten sich hier durch eine starke Variabilität der Farbintensität aus (Abb. 34). Die Ganglienzellen und amakrinen Zellen zeigten dabei allerdings stets eine zumindest leicht stärkere Anfärbung ihrer Zellkerne.

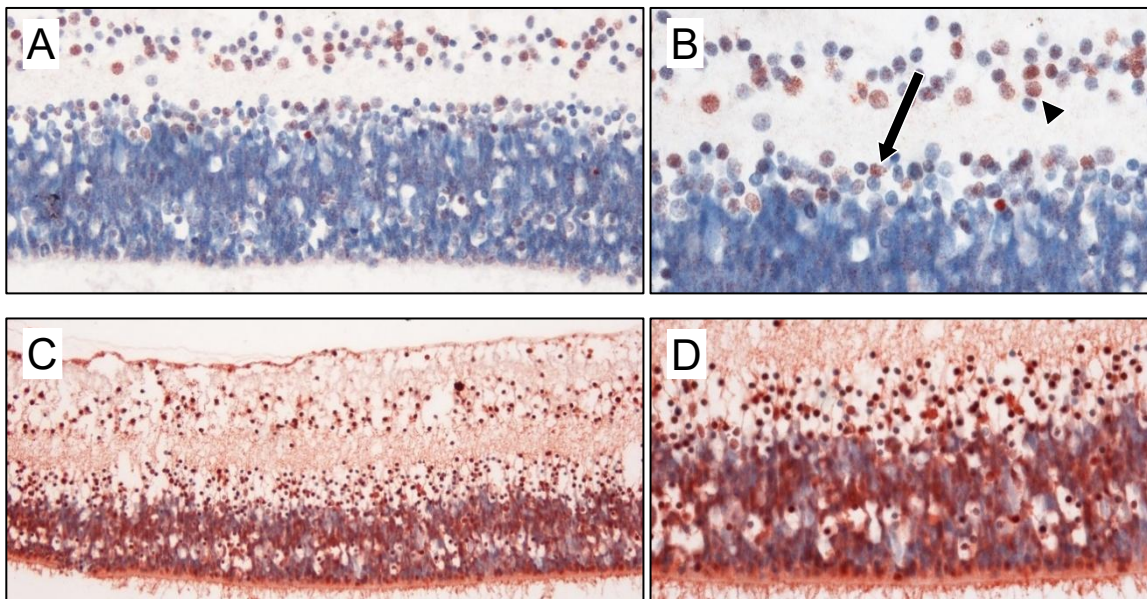


Abb. 34: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 17-18 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 17. SSW. C, D: zentrale Retina, 18. SSW. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Leicht erhöhte Anfärbung der Zellkerne von Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrinen Zellen (Pfeil). D: 400fache Vergrößerung

3.7.5 Woche 19 und 20

In dieser Altersstufe lagen fünf Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: Die Färbungen zeichneten sich insgesamt durch eine hohe Farbintensität aus (Abb. 35). In den zentralen und peripheren Bereichen der Retina wiesen die Zellkerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen bereits eine intensive Anfärbung auf. In den zentralen Bereichen präsentierten sich die übrigen Zelltypen mit einem noch höheren Grad der Färbung. In der Peripherie zeigten sich dagegen in einem Teil der Präparate ein Großteil der Zellkerne in der INL nicht gefärbt, darunter vor allem die Kerne der Müllerzellen.

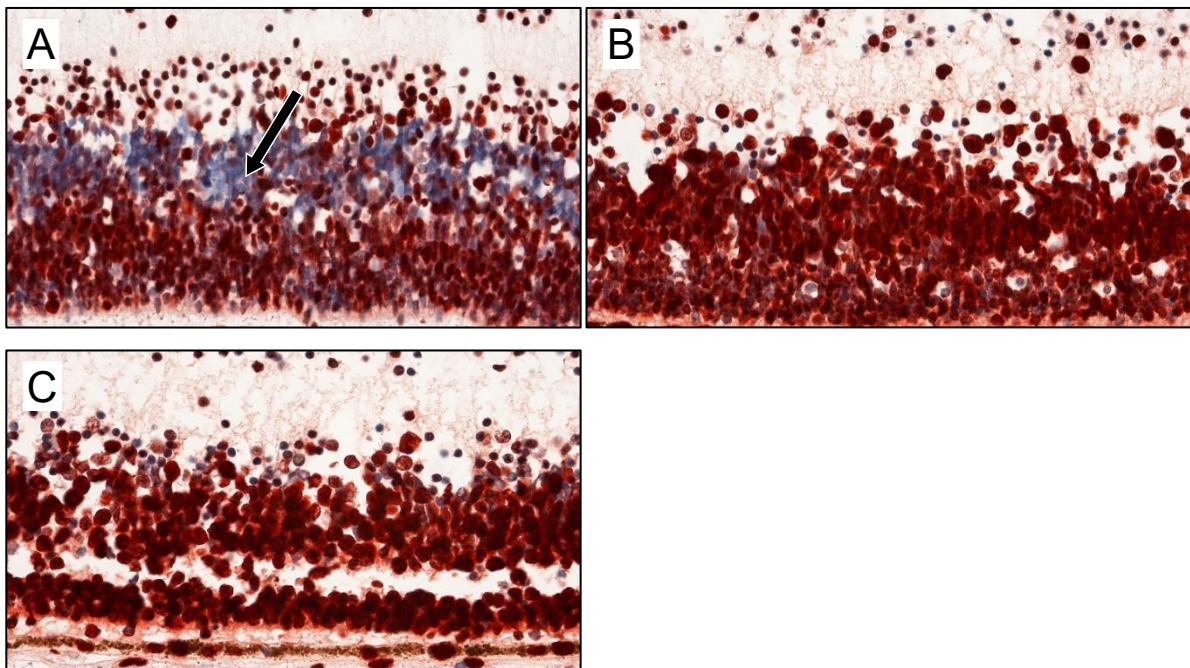


Abb. 35: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 19 SSW, Retina. A, B: periphere Retina. C: zentrale Retina. A: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Zellkerne von Müllerzellen (Pfeil). B: 400fache Vergrößerung. Intensive Färbung in den Müllerzellen. C: 400fache Vergrößerung

Anti-H4Ac: Hier stellte sich ein ähnliches Bild zu der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac dar (Abb. 36). Die Färbung der Zellkerne von amakrinen Zellen und Ganglienzellen fiel hier darüber hinaus noch schwächer aus. In der zentralen Retina waren die übrigen Zellkerne stark angefärbt, während in der Peripherie die Kerne der Zellen der INL, insbesondere von Müllerzellen, nicht angefärbt waren.

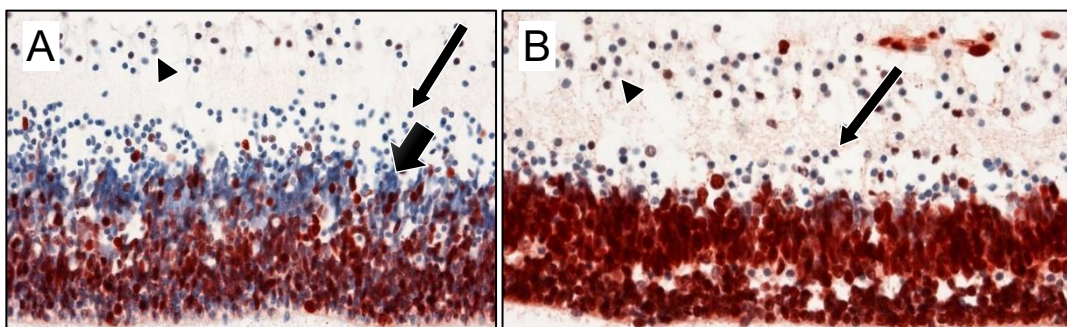


Abb. 36: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 19 SSW, Retina. A: periphere Retina. B: zentrale Retina. A: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung der Zellkerne von Ganglienzellen (Pfeilspitze), amakrinen Zellen (Pfeil) und Müllerzellen (dicker Pfeil). B: 400fache Vergrößerung. Schwache Färbung in Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrinen Zellen (Pfeil), starke Färbung in den übrigen Zelltypen

Anti-5MeC: Unter der Färbung mit diesem Antikörper waren in der zentralen Retina alle Zelltypen stark angefärbt (Abb. 37). Ausnahmen mit einer schwachen Färbung bestanden lediglich in einem Präparat bei den Zellkernen von amakrinen Zellen und in einem weiteren Präparat bei den Kernen von Müllerzellen. In der Peripherie stellte sich das Bild der Färbungen inkonstant dar. Bei zwei Präparaten zeigte sich bei allen Zelltypen eine stärkere Färbung. Bei zwei weiteren Präparaten waren lediglich die Zellkerne der Müllerzellen in niedrigem Maße gefärbt, in einem dieser Präparate zeigten sich schwächer gefärbte Kerne der Müllerzellen in den zentralen Retina-Bereichen.

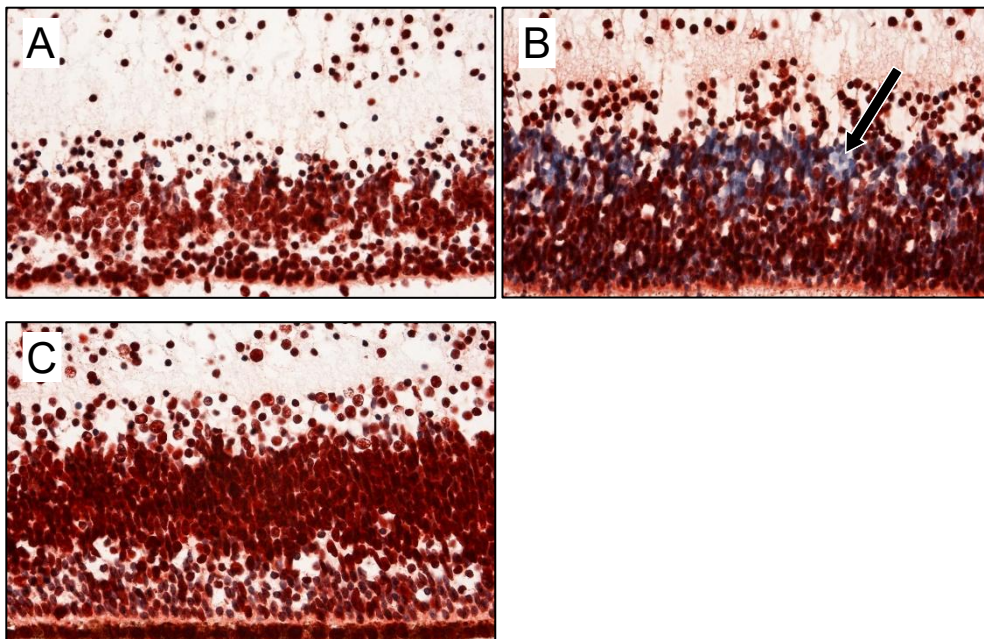


Abb. 37: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 19 SSW, Retina. A: zentrale Retina, 19. SSW. B, C: periphere Retina, 19. SSW. A: 400fache Vergrößerung. Starke Färbung in allen Zelltypen. B: 400fache Vergrößerung. Ein Teil der Müllerzellen (Pfeil) zeigt nur eine schwache Färbung der Zellkerne, restliche Kerne stark gefärbt. C: 400fache Vergrößerung

Anti-5hMeC: In einem der Präparate war nur eine sehr gering ausgeprägte Färbung sowohl im zentralen als auch im peripheren Bereich der Retina zu erkennen (Abb. 38). Bei den übrigen Präparaten zeigte sich insgesamt eine starke Intensität der Färbung mit durchgehender Anfärbung aller Zellkerne, ausgenommen waren nur die Zellkerne der Müllerzellen. Der Anteil der nicht angefärbten Kerne nahm dabei zur Peripherie hin zu.

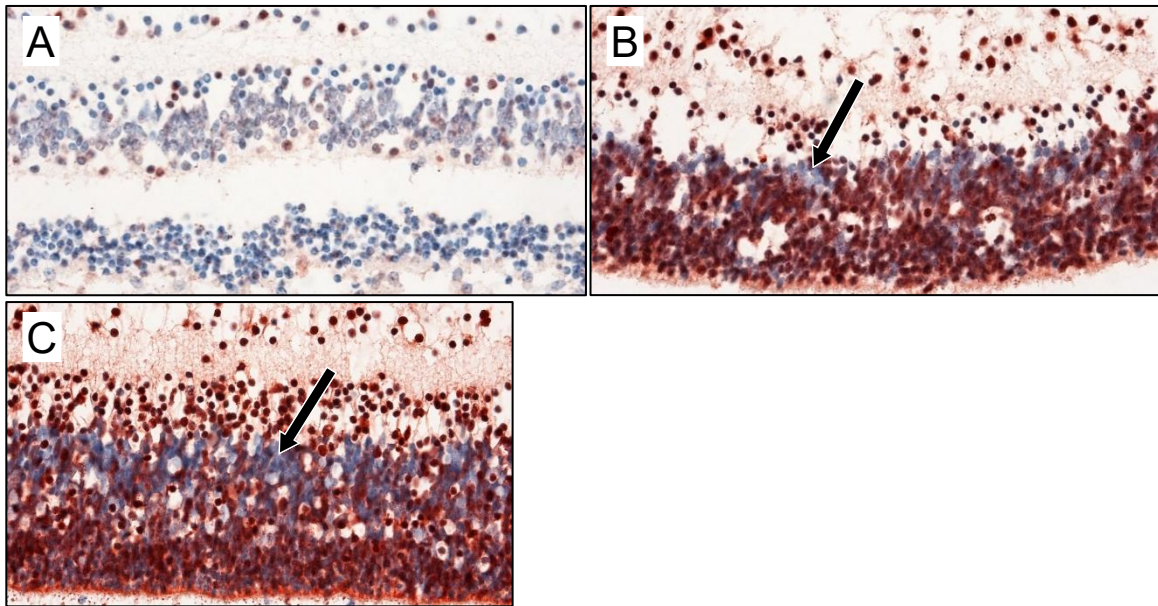


Abb. 38: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 19-20 SSW, Retina. A: zentrale Retina, 20. SSW. B: zentrale Retina, 19. SSW. C: periphere Retina, 19. SSW. A: 400fache Vergrößerung. Minimale Färbung in allen Zelltypen. B: 400fache Vergrößerung. Einige Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil) mit nur schwacher Färbung, restliche Zellkerne stark gefärbt. Im Vergleich zu den anderen Altersstufen wirkt die Schichtung noch weniger differenziert. C: 400fache Vergrößerung. Anteil der gefärbten Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil) im Vergleich zu B reduziert

3.7.6 Woche 21 und 22

In der zentralen Retina zeigte sich erstmals die adulte Konfiguration der retinalen Zellschichten mit klarer Trennung zwischen ONL, INL und GCL. In den peripheren Abschnitten war diese Separierung noch nicht vollzogen. In dieser Altersstufe lagen fünf Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: In der zentralen Retina zeigte sich eine schwache Anfärbung der Zellkerne von amakrinen Zellen und Ganglienzellen (Abb. 39). Die übrigen Zellkerne der zentralen Retina wiesen eine mäßig starke Färbung auf. In der Peripherie präsentierten sich die amakrinen Zellen und Ganglienzellen ebenfalls mit einer gering ausgeprägten Färbung ihrer Kerne, darüber hinaus zeigte sich eine nur geringgradige Farbintensität der Kerne der Müllerzellen. Die restlichen Zellkerne der peripheren Retina ließen eine im Vergleich zur zentralen Retina stärkere Färbung erkennen.

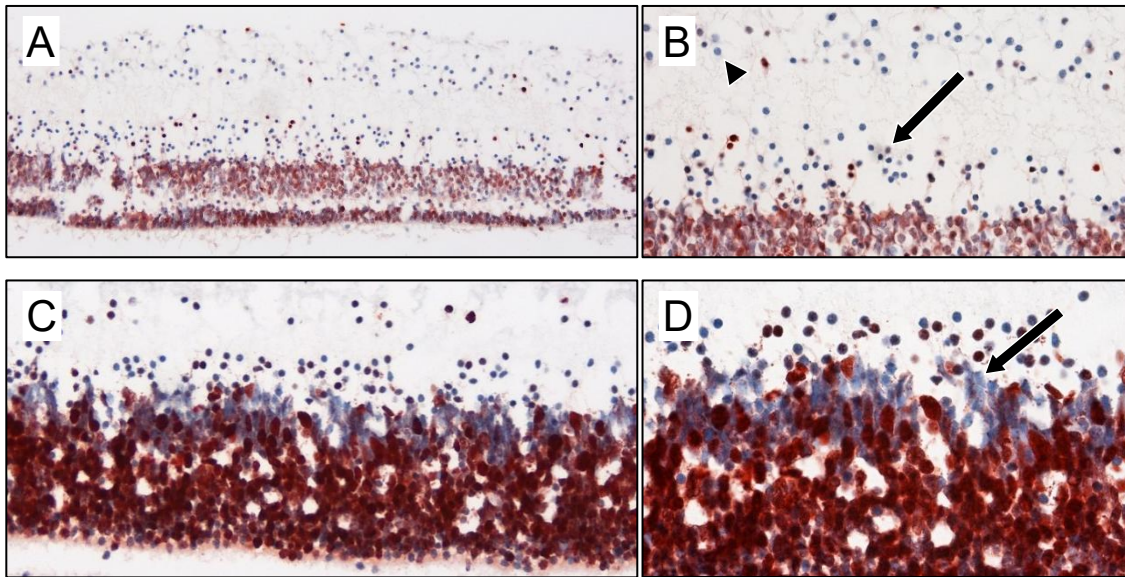


Abb. 39: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 21-22 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina, 21. SSW. C, D: periphere Retina, 22 SSW. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrine Zellen (Pfeil) mit gering gefärbten Zellkernen. D: 400fache Vergrößerung. Die Kerne der Müllerzellen (Pfeil) zeigen eine schwache Färbung

Anti-H4Ac: Die Färbung mit diesem Antikörper führte zur Ausprägung unterschiedlicher Muster in der zentralen Retina. In einem Teil der Präparate waren lediglich die Kerne von Ganglienzellen und Müllerzellen stark gefärbt und grenzten sich damit deutlich von den übrigen Zelltypen ab (Abb. 40). In anderen Präparaten wiederum waren, ähnlich wie beim Antikörper Anti-H3Ac, die Zellkerne von Ganglienzellen, amakrinen Zellen und der sonst stark gefärbten Müllerzellen nicht gefärbt, während die anderen Zelltypen eine intensivere Färbung erkennen ließen. In der peripheren Retina waren die Zellkerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen nicht angefärbt. Die restlichen Zelltypen zeigten eine starke Variabilität in ihrer Farbintensität.

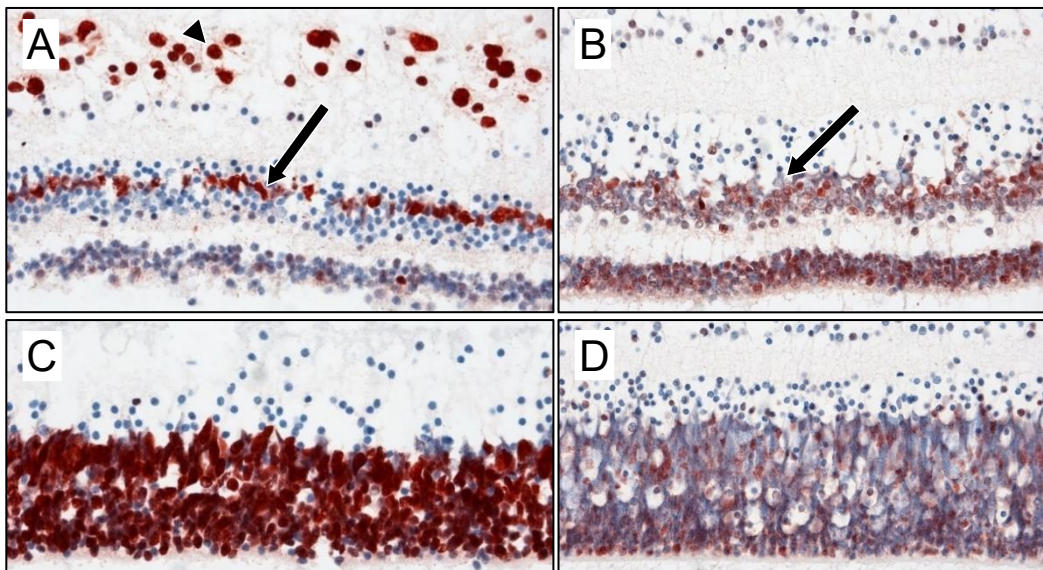


Abb. 40: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 22 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A: 400fache Vergrößerung. Müllerzellen (Pfeil) und Ganglienzellen (Pfeilspitze) grenzen sich deutlich von den übrigen Zelltypen ab. B: 400fache Vergrößerung. Ungefärbte Kerne der Müllerzellen (Pfeil). C: Periphere Retina von A, 400fache Vergrößerung. D: Periphere Retina von B, 400fache Vergrößerung

Anti-5MeC: Die Intensität der Färbung war in diesem Zeitraum stark ausgeprägt und betraf fast alle Zellkerne (Abb. 41). Ausnahme waren die Kerne der Müllerzellen, die in den zentralen Bereichen vereinzelt und in der peripheren Retina regelmäßig nicht angefärbt waren.

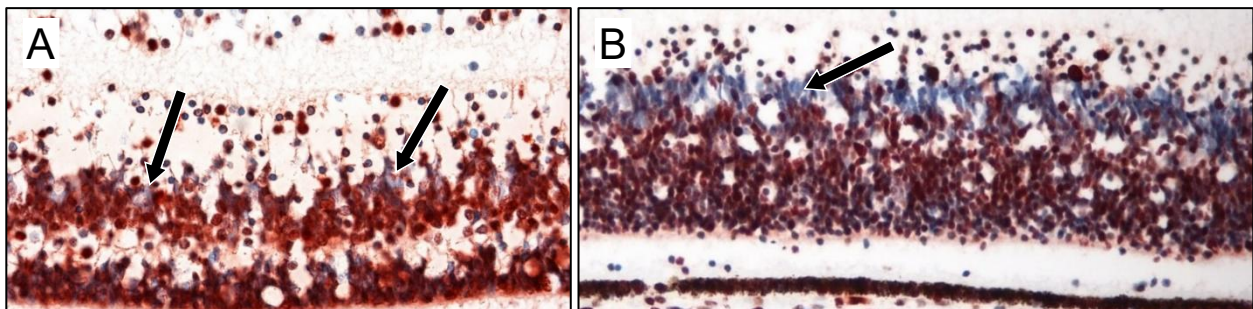


Abb. 41: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 22 SSW, Retina. A: zentrale Retina. B: periphere Retina. A: 200fache Vergrößerung. Vereinzelt Kerne der Müllerzellen (Pfeile) sind nicht angefärbt. B: 200fache Vergrößerung. Die nicht angefärbten Zellkerne der Müllerzellen sind zu erkennen (Pfeil)

Anti-5hMeC: Der Grad der Färbeintensität der Zellkerne war generell gering (Abb. 42). Stärker gefärbte Areale fanden sich in den Präparaten teilweise in den Ganglienzellen

und amakrinen Zellen sowohl in der peripheren als auch in der zentralen Retina. Insgesamt war die Färbung zwischen zentraler und peripherer Retina hier gleichförmig.

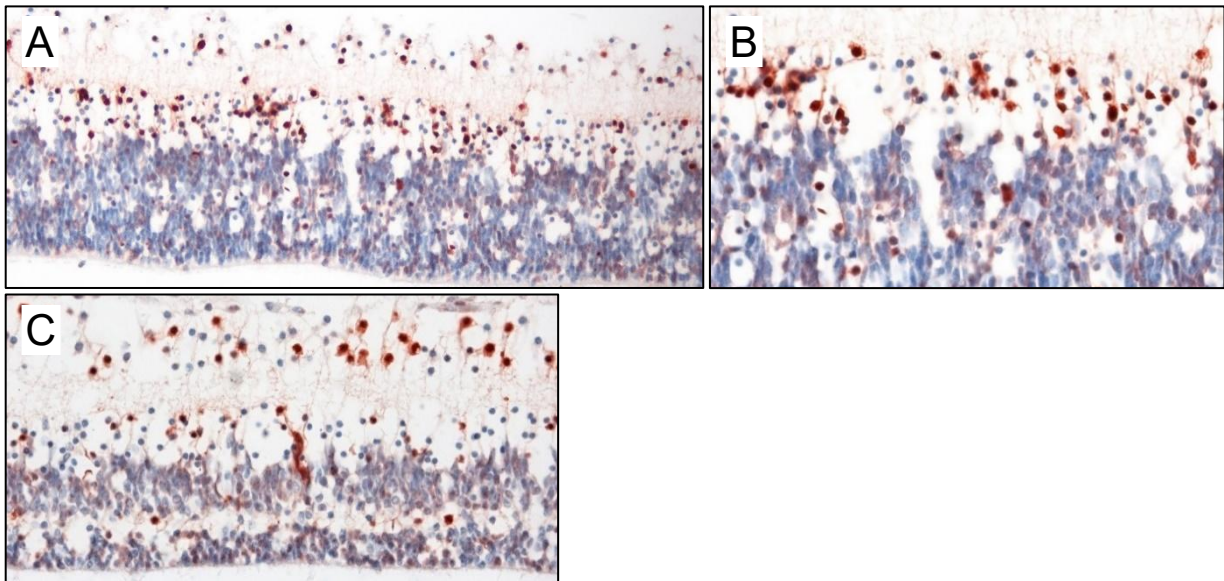


Abb. 42: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 21 SSW, Retina. A, B: periphere Retina. C: zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. C: Zentrale Retina von A und B, 400fache Vergrößerung

3.7.7 Woche 23 und 24

In dieser Altersstufe lagen drei Präparate zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: In den zentralen Bereichen der Retina zeigten alle Zelltypen eine gleichförmig starke Färbung (Abb. 43). In der Peripherie wiesen die Zellkerne der Müllerzellen in allen Präparaten nur vereinzelt Färbungen auf. Die restlichen Zelltypen ließen einen ähnlichen Färbeaspekt wie in der zentralen Retina erkennen.

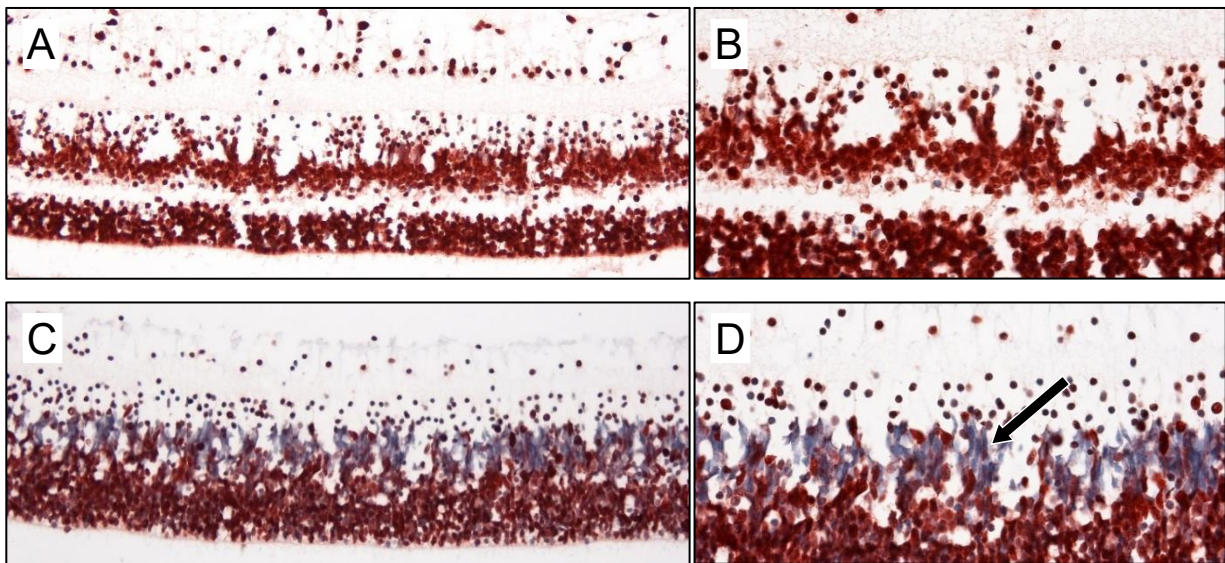


Abb. 43: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 23 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. D: 400fache Vergrößerung. Müllerzellen (Pfeil) mit schwächerer Färbung

Anti-H4Ac: In der zentralen Retina wiesen insbesondere die Müllerzellen und die Photorezeptorzellen starke Färbungen der Zellkerne auf (Abb. 44). Die Kerne der amakrinen Zellen waren schwach gefärbt, die Kerne der Ganglienzellen zeigten sich inhomogen und waren je nach Präparat stark oder schwach gefärbt. Die restlichen Zellen der INL präsentierten sich mit einem mäßig stark gefärbten Zellkern. In der peripheren Retina zeigten die Zellkerne der Ganglienzellen, amakrinen Zellen und Müllerzellen nur eine geringe Farbinintensität. Die übrigen Zelltypen zeigten durchgehend eine starke Färbung.

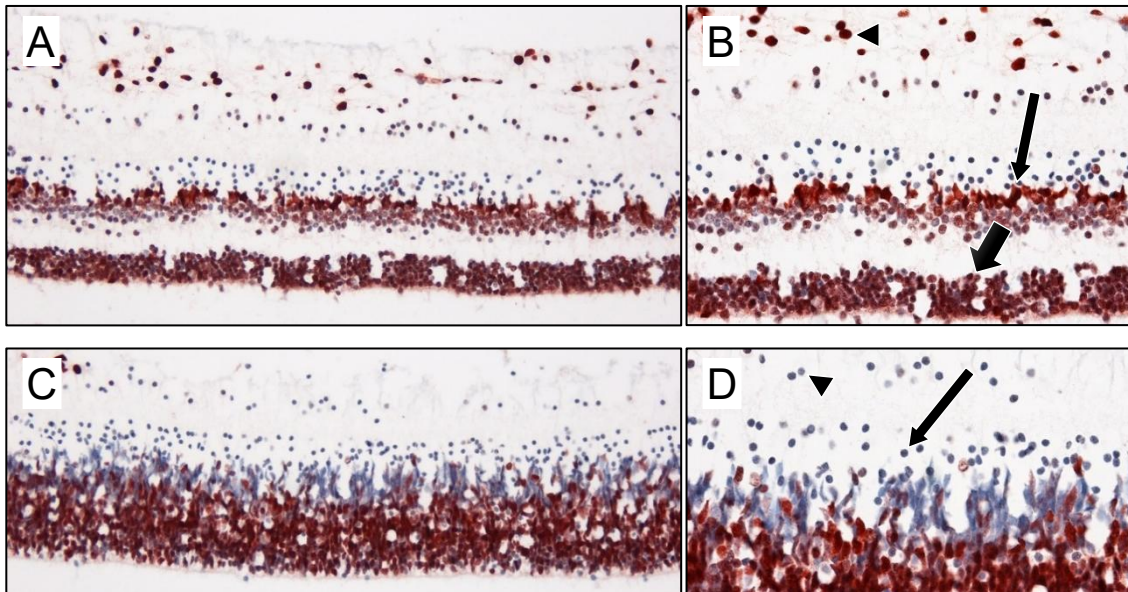


Abb. 44: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 23 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung. Starke Kernfärbung von Ganglienzellen (Pfeilspitze), Müllerzellen (Pfeil) und Photorezeptorzellen (dicker Pfeil) in B, schwache Färbung dieser Zelltypen in D

Anti-5MeC: Über alle Zelltypen hinweg zeigte sich eine schwache Färbung, lediglich die Kerne der Ganglienzellen wiesen eine stärkere Färbung auf (Abb. 45).

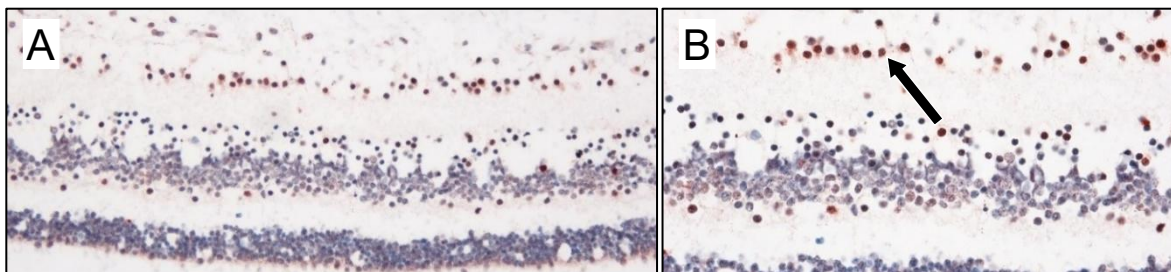


Abb. 45: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 23 SSW, zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Die Kerne der Ganglienzellen (Pfeil) sind stärker gefärbt als die restlichen Zellkerne

Anti-5hMeC: Es bestanden große Ähnlichkeiten zur Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC (Abb. 46). Es zeigte sich ebenso eine insgesamt schwache Färbung im Präparat sowie eine verstärkte Anfärbung der Kerne der Ganglienzellen.

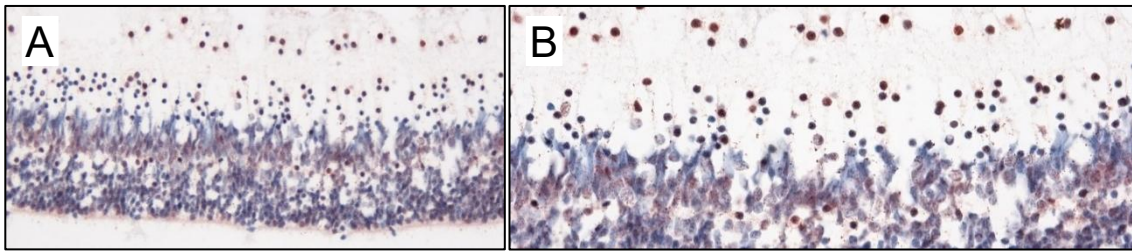


Abb. 46: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 23 SSW, periphere Retina. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung

3.7.8 Woche 26

In dieser Altersstufe lag ein Präparat zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: Es zeigten sich in allen Schichten Zellkerne mit stark wechselnder Farbintensität sowie ungefärbte Zellkerne (Abb. 47). Die Müllerzellen präsentierten sich zwar ebenfalls mit wechselnder Farbintensität ihrer Kerne, diese waren aber in den meisten Fällen gefärbt.

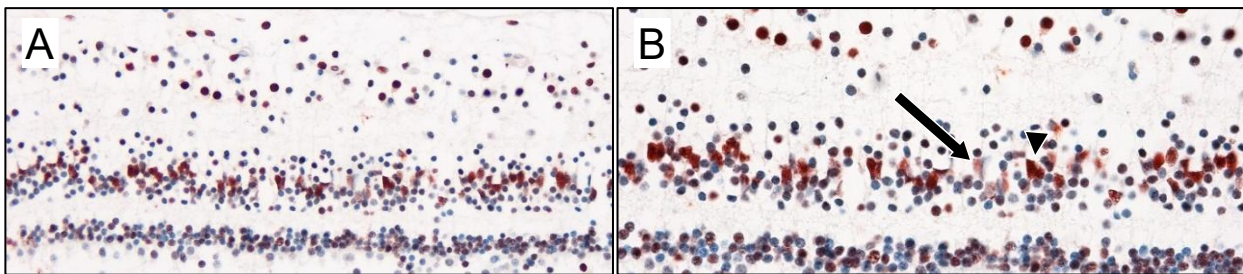


Abb. 47: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 26 SSW, zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Kerne der Müllerzellen teilweise stark gefärbt (Pfeilspitze), teilweise schwach gefärbt (Pfeil)

Anti-H4Ac: In den zentralen Bereichen der Retina wiesen die Kerne der Müllerzellen durchgehend eine starke Färbung auf und hoben sich damit deutlich von den nur schwach bis sehr gering gefärbten übrigen Zellkernen ab (Abb. 48). In den peripheren Bereichen waren die Kerne der Müllerzellen dagegen nicht gefärbt, hier waren die in den zentralen Bereichen weitgehend schwach gefärbten Kerne der Ganglienzellen in hohem Maß gefärbt.

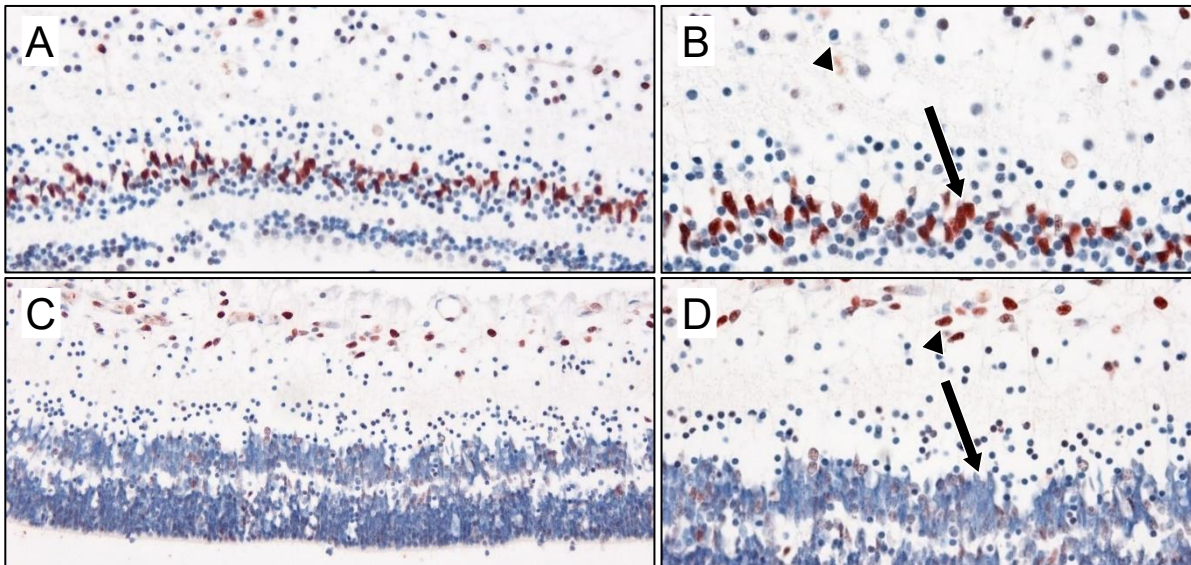


Abb. 48: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 26 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Kerne der Müllerzellen (Pfeil) mit starker Färbung, Zellkerne der Ganglienzellen (Pfeilspitze) mit schwacher Färbung. D: 400fache Vergrößerung. Kerne der Müllerzellen (Pfeil) ohne Anfärbung, Zellkerne der Ganglienzellen (Pfeilspitze) größtenteils stark gefärbt

Anti-5MeC: In den zentralen Bereichen der Retina zeigten die Kerne der Photorezeptorzellen lediglich eine schwache Färbung (Abb. 49). Die übrigen Zelltypen waren mit einer überwiegend mäßigen Färbung etwas stärker angefärbt. In der peripheren Retina waren neben gefärbten Zellkernen viele ungefärbte Zellkerne mit einer relativ unzusammenhängend wirkenden Verteilung zwischen gefärbten und ungefärbten Arealen anzutreffen.

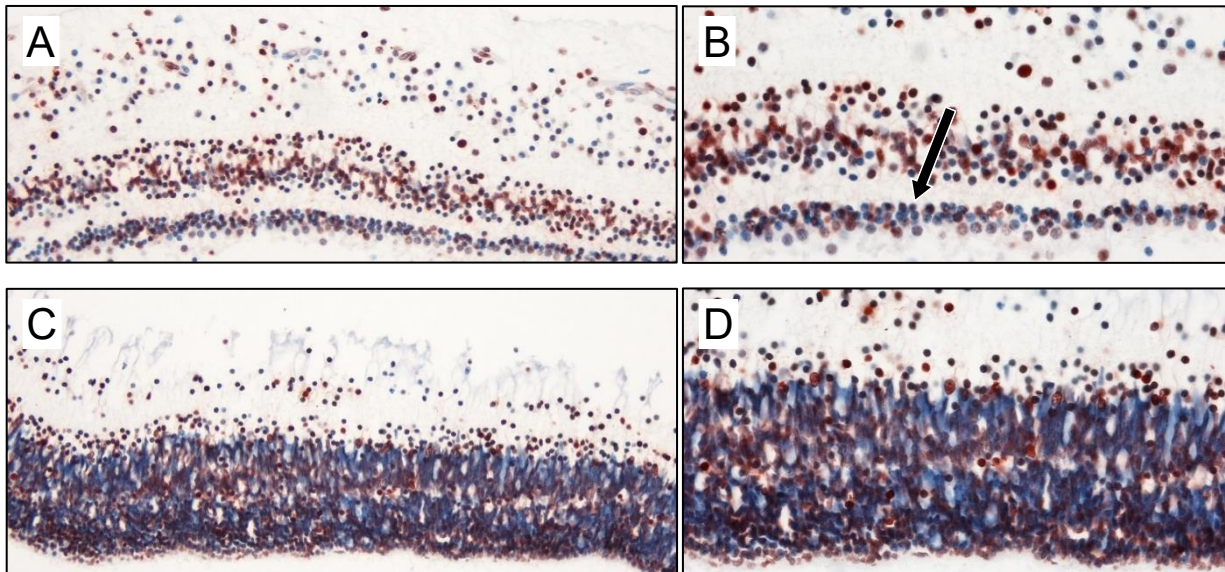


Abb. 49: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 26 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Zellkerne der Photorezeptorzellen (Pfeil) mit schwacher Färbung. D: 400fache Vergrößerung

Anti-5hMeC: Der Großteil der Zellkerne ließ in den Präparaten nur eine geringe Farbin-
tensität erkennen (Abb. 50). Die Zellkerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen zeig-
ten teilweise eine mäßige bis starke Anfärbung, ansonsten fanden sich in der INL und
ONL nur vereinzelt stärker angefärbte Zellkerne.

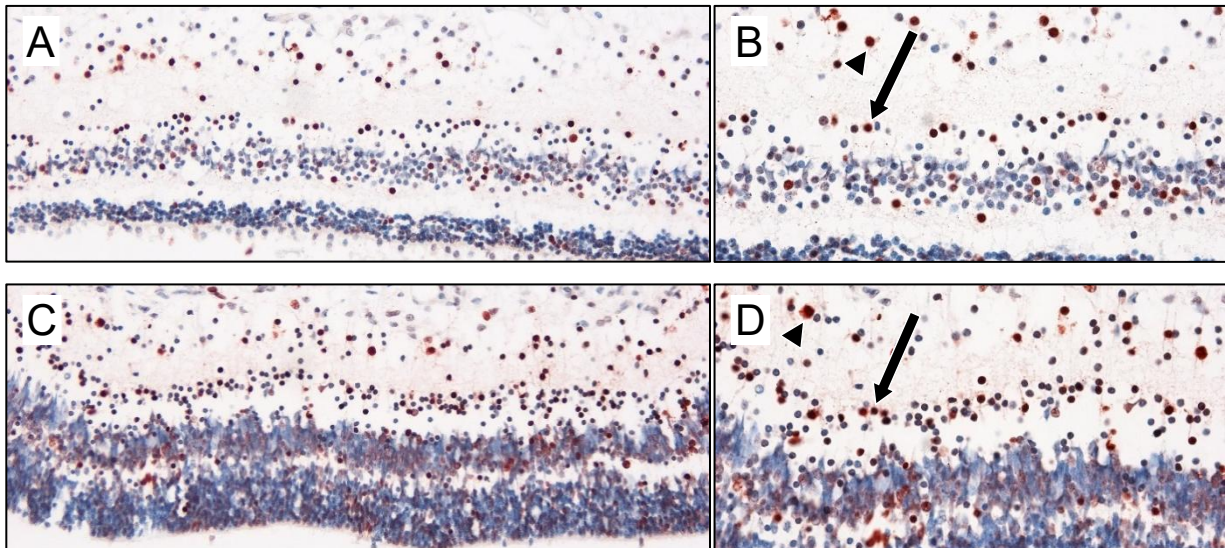


Abb. 50: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 26 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Zellkerne der Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrinen Zellen (Pfeil) mit verstärkter Anfärbung. D: 400fache Vergrößerung. Ganglienzellen (Pfeilspitze) und amakrine Zellen (Pfeil) mit stärkerer Färbung ihrer Kerne

3.7.9 Woche 32

In dieser Altersstufe war der Aufbau der charakteristischen Schichtarchitektur der Retina auch in ihren peripheren Bereichen vollzogen. Damit einhergehend ließen sich Unterschiede des Färbeverhaltens zwischen zentralen und peripheren Abschnitten nur noch in geringerem Ausmaß erkennen. In dieser Altersstufe lag ein Präparat zur Auswertung vor. **Anti-H3Ac:** In Bezug auf die INL und ONL ergab sich zwischen zentraler und peripherer Retina ein ähnliches Bild (Abb. 51). In der INL war der überwiegende Anteil der Zellkerne stark angefärbt, während die Kerne der Müllerzellen von der Färbung weitgehend ausgespart blieben. In der ONL zeigten sich sowohl stärker gefärbte als auch ungefärbte Zellkerne. Wesentliche Unterschiede zwischen zentraler und peripherer Retina bestanden in der GCL: In den zentralen Bereichen waren die Zellkerne der Ganglienzellen stark angefärbt, in den peripheren Bereichen war ein hoher Anteil ungefärbter Zellkerne zu finden.

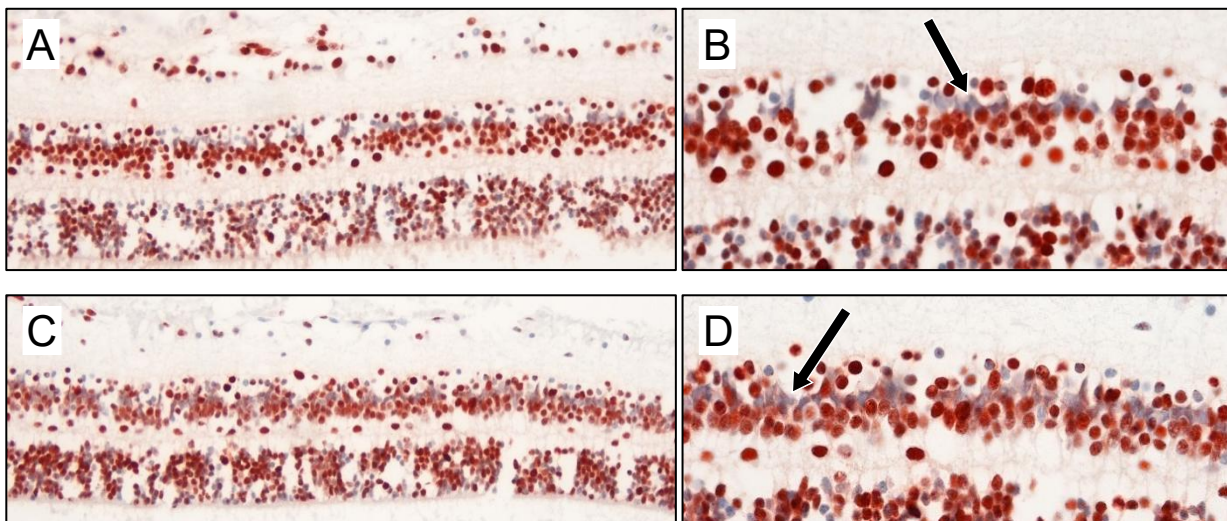


Abb. 51: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 32 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung. Die Kerne der Müllerzellen (Pfeil) zeigen sich weitgehend ungefärbt

Anti-H4Ac: Es bestand grundsätzlich eine große Ähnlichkeit mit der Färbung des Antikörpers Anti-H3Ac, im Vergleich hierzu war der Anteil von gefärbten Zellkernen in der INL erhöht, bei gleichzeitig ungefärbten Zellkernen der Müllerzellen (Abb. 52). Die Kerne der Ganglienzellen zeigten sich hier zentral und peripher mit intensiver Färbung.

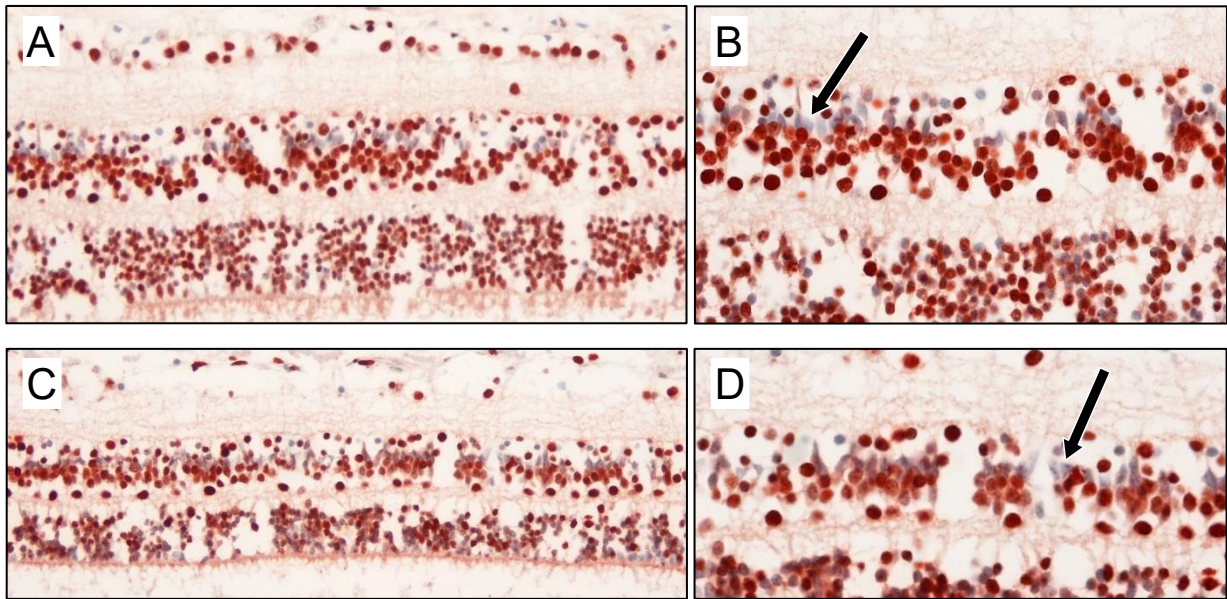


Abb. 52: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 32 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung. Die Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil) zeigen eine geringe Anfärbung

Anti-5MeC: Die Intensität der Färbung lag in diesem Präparat auf einem hohen Niveau, gleichzeitig fanden sich insbesondere in der ONL ein hoher Anteil ungefärbter Zellkerne (Abb. 53). In der INL war der Anteil der ungefärbten oder gering gefärbten Zellkerne gering, in der GCL fanden sich nur vereinzelt ungefärbte Zellkerne.

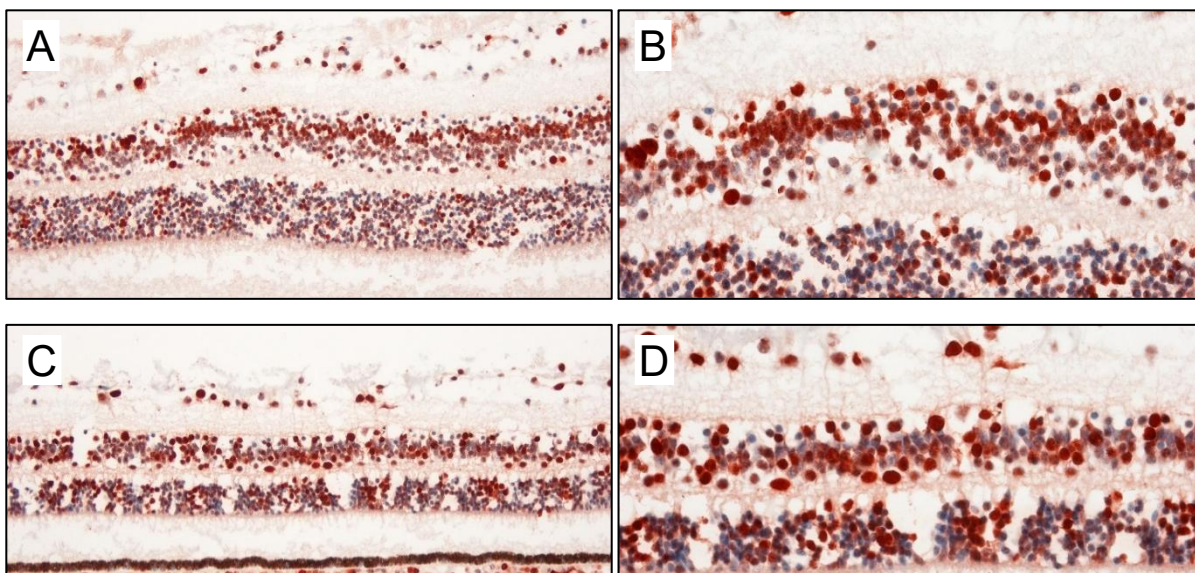


Abb. 53: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 32 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

Anti-5hMeC: Bei diesem Antikörper zeigte sich insgesamt eine geringe Ausprägung der Färbung (Abb. 54). In der INL existierten jedoch vereinzelte Zellen mit mäßig bis stark gefärbten Zellkernen. Diese ließen sich am ehesten, ihrer Lage entsprechend, als amakrine Zellen und Horizontalzellen identifizieren.

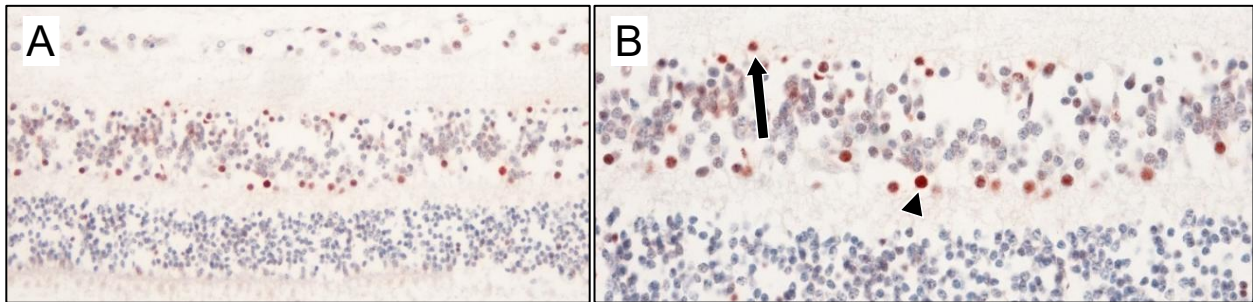


Abb. 54: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 32 SSW, zentrale Retina. A: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Vereinzelt stärker gefärbte Kerne von amakrinen Zellen (Pfeil) und Horizontalzellen (Pfeilspitze)

3.7.10 Woche 34

In dieser Altersstufe lag ein Präparat zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: Der Anteil gefärbter Zellkerne unterschied sich nicht wesentlich zwischen zentraler und peripherer Retina. Allerdings wiesen die Zellkerne in der Peripherie eine leicht erhöhte Farbintensität auf (Abb. 55). In allen Zellschichten zeigten sich regelmäßig ungefärbte Zellkerne. Aus dem Färbeverhalten einzelner Zelltypen ließen sich keine Rückschlüsse auf eine allgemein vermehrte oder verminderte Färbung ziehen.

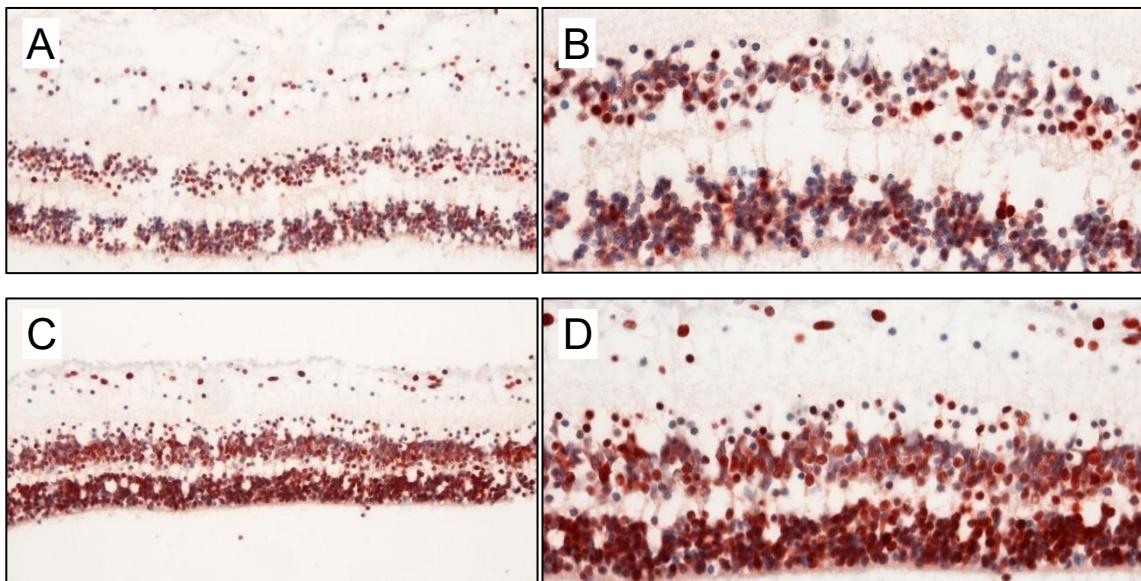


Abb. 55: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 34 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

Anti-H4Ac: Die INL wies in allen Bereichen nur einen geringen Anteil stärker gefärbter Zellkerne auf, größtenteils fanden sich hier nur schwach gefärbte oder ungefärbte Kerne (Abb. 56). In der ONL nahmen sowohl der Anteil als auch die Intensität der gefärbten Zellkerne zur Peripherie hin zu. Die Zellkerne der Ganglienzellen zeigten ein unregelmäßiges Verhalten zwischen starker und ausbleibender Färbung.

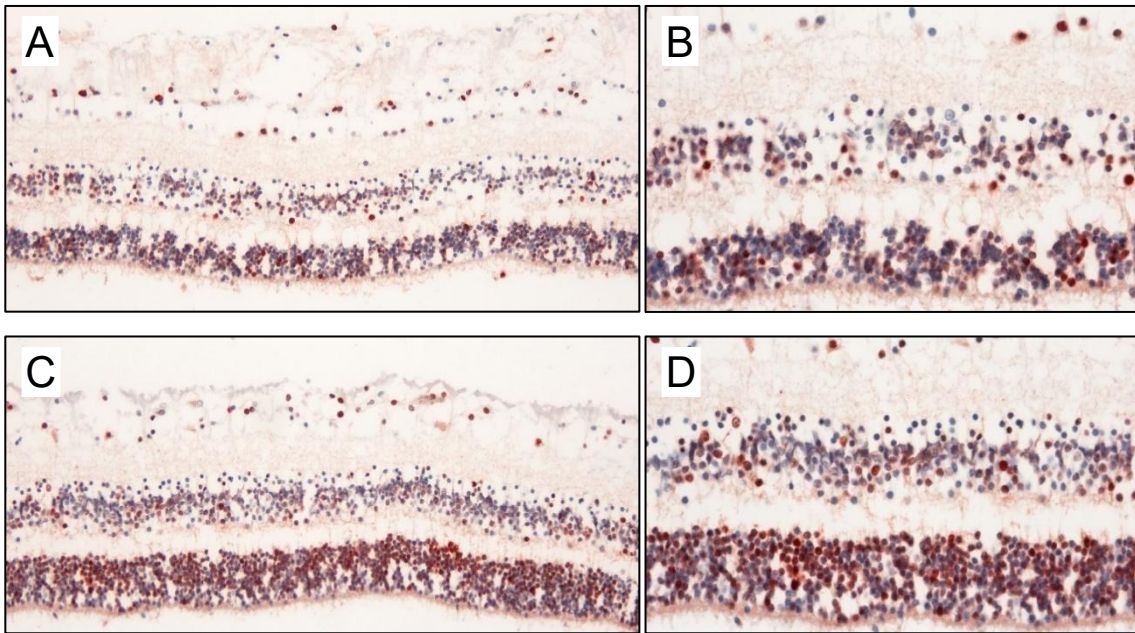


Abb. 56: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 34 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

Anti-5MeC: Bei diesem Antikörper ließen sich Ähnlichkeiten im Färbeverhalten zu den anderen Antikörpern erkennen: In den zentralen Bereichen zeigte sich ein geringerer Anteil gefärbter Zellkerne und eine geringere Intensität der Färbung (Abb. 57). In der Peripherie nahmen sowohl Anteil als auch Farbintensität in allen Zellschichten zu.

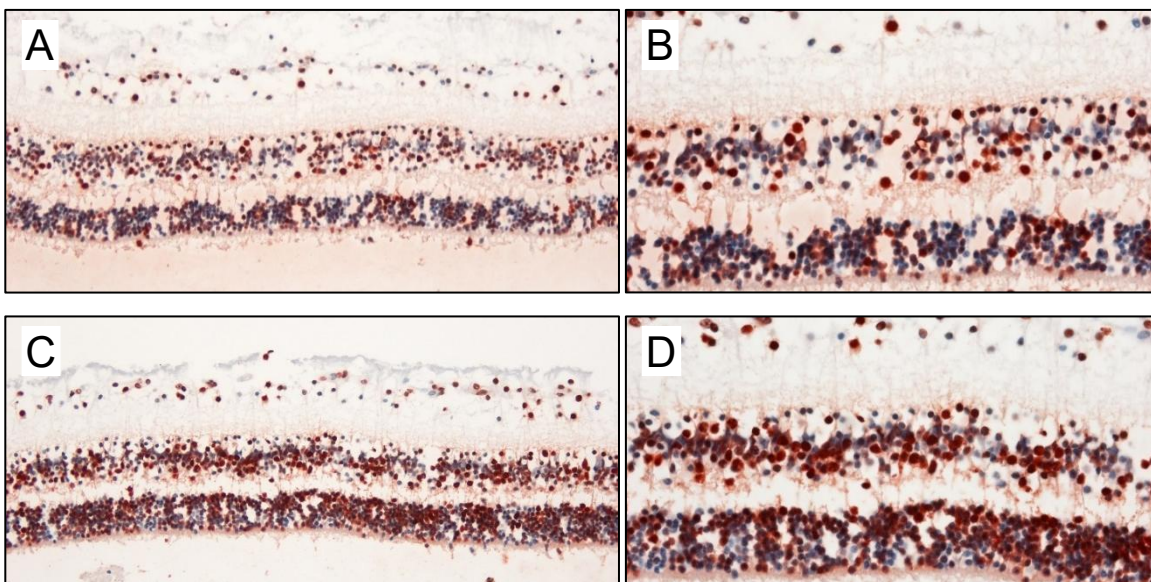


Abb. 57: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 34 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

Anti-5hMeC: Die Zellkerne aller Schichten zeigten in der zentralen Retina zum großen Teil eine schwache, häufig auch eine ausbleibende Färbung mit diesem Antikörper (Abb. 58). Lediglich in der INL fanden sich vereinzelt stark angefärbte Zellkerne. Zur Peripherie hin nahm der Anteil an gefärbten Zellkernen in allen Schichten zu, vornehmlich in der INL.

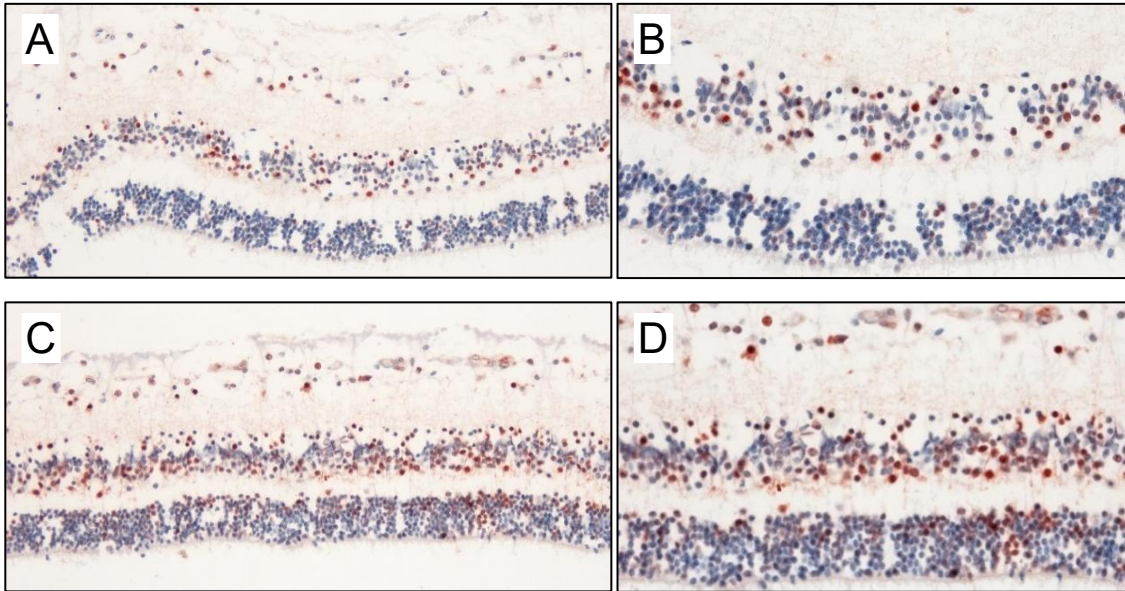


Abb. 58: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 34 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

3.7.11 Woche 38

In dieser Altersstufe lag ein Präparat zur Auswertung vor.

Anti-H3Ac: Sowohl in den zentralen als auch den peripheren Anteilen der Retina zeigte sich in den meisten Abschnitten eine mäßige Färbung (Abb. 59). Darüber hinaus kamen je nach Lokalisation stärker gefärbte Zellkerne zur Darstellung. Die zentrale Retina präsentierte sich mit stark gefärbten Zellkernen in der INL, einen wesentlichen Anteil davon machten die Kerne der Müllerzellen aus. In der peripheren Retina ließen sich neben stärker gefärbten Zellkernen in der INL außerdem intensiv angefärbte Zellkerne in der ONL erkennen.

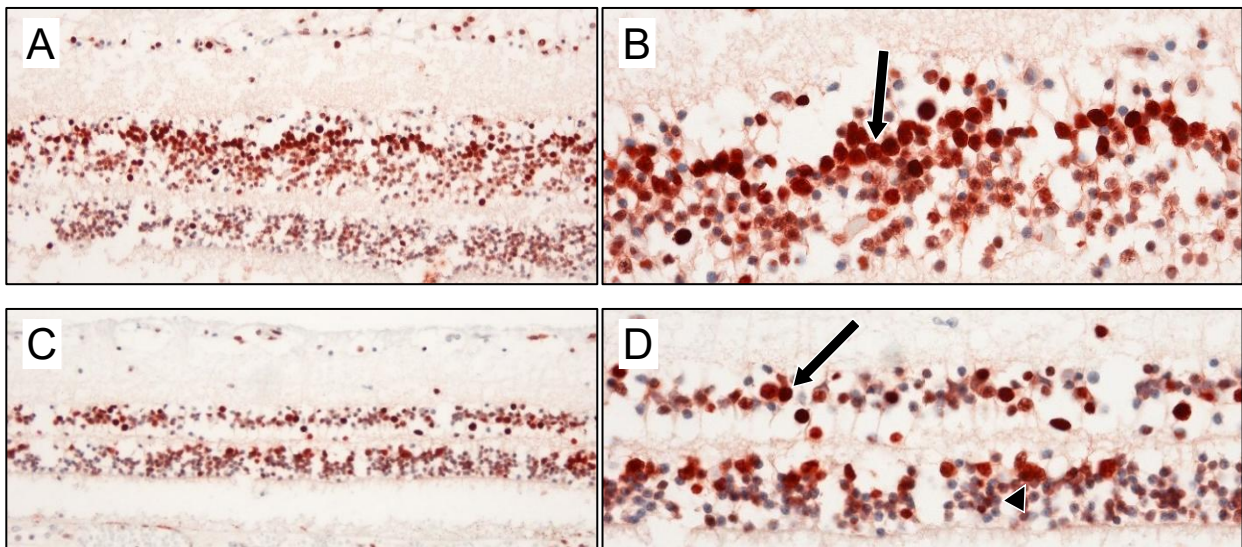


Abb. 59: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 38 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Stark gefärbte Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil). D: 400fache Vergrößerung. Stark gefärbte Zellkerne finden sich in der INL (Pfeil) und ONL (Pfeilspitze)

Anti-H4Ac: In der zentralen Retina ließ sich eine intensive Färbung von Zellkernen der INL nachweisen (Abb. 60). Darunter fielen zu einem überwiegenden Anteil Müllerzellen, die anderen Zelltypen waren in geringerer Anzahl vertreten. Die intensive Anfärbung der Kerne von Müllerzellen war in der Peripherie nicht mehr nachzuweisen, die Färbung der übrigen Zellkerne der INL blieb bestehen.

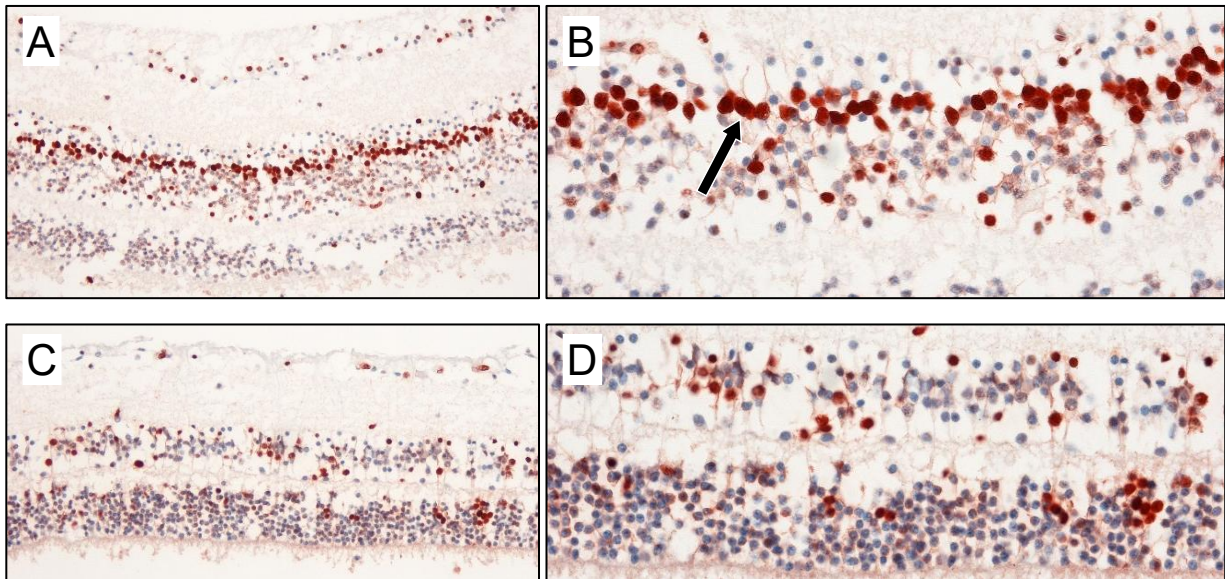


Abb. 60: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 38 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B: 400fache Vergrößerung. Vor allem die Kerne der Müllerzellen (Pfeil) zeigen eine Anfärbung. D: 400fache Vergrößerung

Anti-5MeC: Die Färbung mit diesem Antikörper ähnelte stark den Färbungen von Anti-H3Ac und Anti-H4Ac (Abb. 61). In den zentralen Abschnitten zeigte sich die verstärkte Anfärbung der Zellkerne von Müllerzellen in der INL, neben gefärbten Zellkernen von weiteren Zelltypen in geringerem Ausmaß. In der Peripherie ließ sich dagegen keine ausgeprägte Färbung der Zellkerne der Müllerzellen nachweisen. In der ONL und der GCL fanden sich unregelmäßig angefärbte Zellkerne mit mäßiger Intensität.

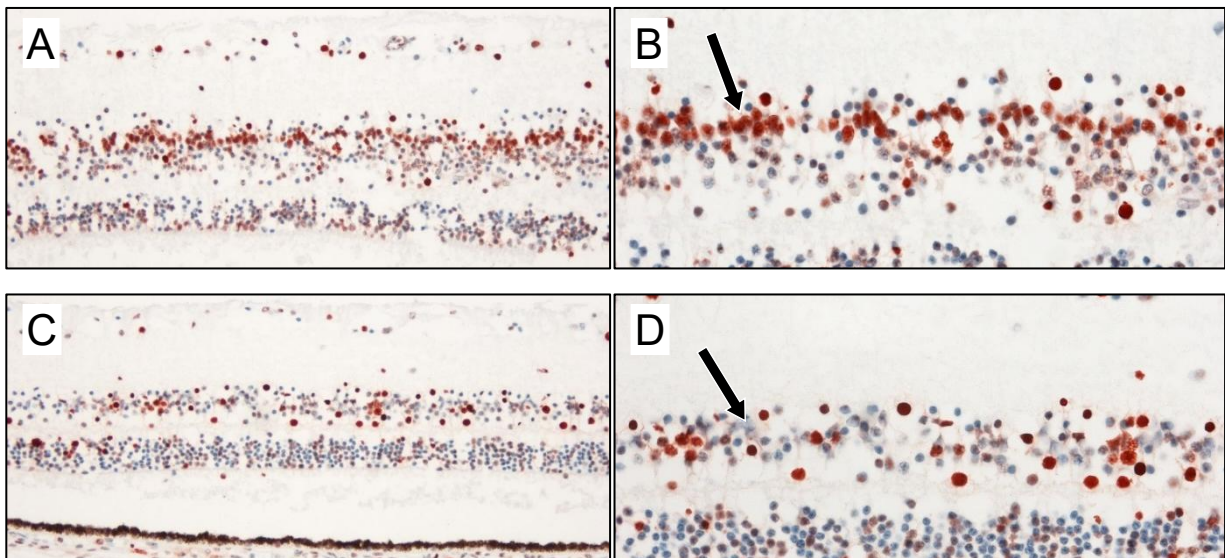


Abb. 61: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 38 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung. Zellkerne der Müllerzellen (Pfeil) mit starker (B) bzw. schwacher Färbung (D)

Anti-5hMeC: Über alle Zelltypen hinweg zeigte sich eine schwache Färbung der Zellkerne (Abb. 62). Vereinzelt stark gefärbte Zellkerne fanden sich in der zentralen Retina in der INL und ONL. In der peripheren Retina waren nur in der INL stärker gefärbte Zellkerne lokalisiert.

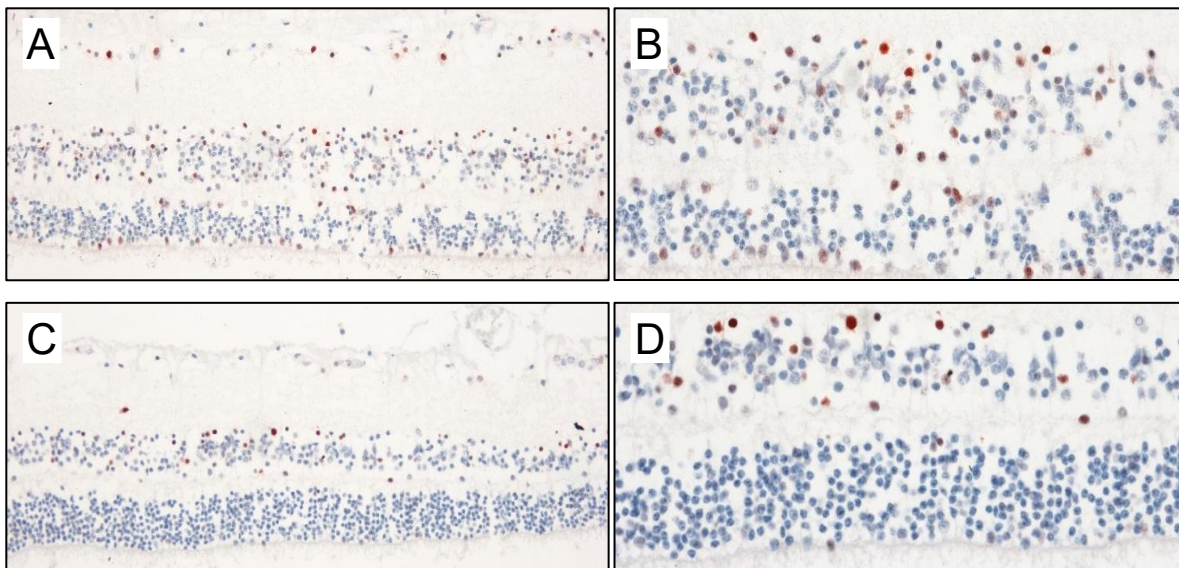


Abb. 62: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 38 SSW, Retina. A, B: zentrale Retina. C, D: periphere Retina. A, C: 200fache Vergrößerung. B, D: 400fache Vergrößerung

4. Diskussion

4.1 Zelltypspezifische Epigenetik der retinalen Zellen

Das Ziel dieser Studie besteht darin, Informationen über den epigenetischen Status während der physiologischen Entwicklung des menschlichen Auges zu erhalten. Generell bestehen nur sehr begrenzte Möglichkeiten, Gewebe von gesunden humanen Feten für wissenschaftliche Fragestellungen zu verwenden. Daher wurde bei der Auswahl der Kohorte sorgfältig darauf geachtet, dass weder eine okuläre Beteiligung noch eine Beeinflussung des Epigenoms durch mögliche zugrundeliegende Pathologien nachweisbar ist. Neben makroskopischen und mikroskopischen morphologischen Veränderungen wurden als weiteres Ausschlusskriterium Chromosomenaberrationen festgelegt, da diese zu einer Veränderung epigenetischer Faktoren führen können (Davidsson et al., 2013; Kerkel et al., 2010; Sharma et al., 2015). Auch bei fehlenden lichtmikroskopischen Veränderungen der Retina ist es denkbar, dass sich fehlerhafte Entwicklungsprozesse eventuell weniger offensichtlich auf das Auge auswirken. Unterschiedliche Studien belegen, dass eine intrauterine Wachstumsretardierung zu verschiedenen morphologischen Veränderungen der Retina führen kann (Ley et al., 2004; Shen et al., 2021). Zusätzlich können diverse Umweltfaktoren Einfluss auf das fetale Epigenom nehmen, solche potentiellen Einflussfaktoren blieben in dieser Studie unberücksichtigt.

Viele Studien, welche die Zusammenhänge zwischen Epigenetik und fetaler Entwicklung untersuchen, werden an Modellorganismen, insbesondere an Mäusen, durchgeführt. Generell sind Veränderungen des Epigenoms während der retinalen Entwicklung zwischen Maus und Mensch zu einem relativ hohem Maß konserviert, dennoch sind die Ergebnisse nur bedingt auf den Menschen übertragbar (Aldiri et al., 2017). Bedeutende Unterschiede zwischen der humanen und murinen Retina, die eine unmittelbare Vergleichbarkeit erschweren, liegen beispielsweise darin, dass Mäuse keine Makula besitzen, die Entwicklung der retinalen Zelltypen folgt einem anderen Schema und aufgrund der Nachtaktivität von Mäusen unterscheidet sich die Verteilung des Chromatins innerhalb der Zellkerne der Stäbchen von der Chromatinanordnung des Menschen (Bibb et al., 2001; Solovei et al., 2009; Telegina et al., 2021). Eine wesentliche Stärke der vorliegenden Studie liegt darin, dass die Untersuchungen an humanen fetalen Augen durchgeführt wurden. Nach unseren Erkenntnissen handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste Studie, welche

epigenetische Faktoren an humanen fetalen Augen in dieser Größenordnung über die gesamte Fetalperiode unter Verwendung der Immunhistochemie betrachtet.

Die meisten Studien über die Epigenetik der Retina verwenden die gesamte Netzhaut für die Untersuchung, ohne zwischen Zelltypen oder den verschiedenen retinalen Entwicklungsstufen zu unterscheiden. In den letzten Jahren wurden allerdings bereits Studien an Mäusen sowie humanem Gewebe durchgeführt, welche das Epigenom einzelner retinaler Zelltypen untersuchten (Hughes et al., 2017; Merbs et al., 2012; Mo et al., 2016; Murphy et al., 2019; Ueno et al., 2016; Ueno et al., 2017; VandenBosch et al., 2020). Diese Studien konnten zeigen, dass sich die retinalen Zellen durch zelltypspezifische Besonderheiten ihres epigenetischen Profils auszeichnen. Die Daten aus der vorliegenden Studie bestätigen die bisher gewonnenen Erkenntnisse, aus denen sich schließen lässt, dass sich die retinalen Zelltypen in ihrem epigenetischen Profil unterscheiden.

Die Methode der Immunhistochemie ist ein auch in der epigenetischen Forschung etabliertes Verfahren (Singh et al., 2018). Immunhistochemische Färbungen können z. B. prognostische Informationen über verschiedene Tumorentitäten liefern, wie für das Nierenzellkarzinom oder das Urothelkarzinom (Barbisan et al., 2008; Mosashvili et al., 2010). Beim Aderhautmelanom sprechen die Untersuchungen von immunhistochemischen Färbungen dafür, dass epigenetische Alterationen in der Pathogenese involviert sind (Herwig-Carl et al., 2019).

Ein Vorteil der immunhistochemischen Untersuchung des Auges liegt darin, dass die gesamte Retina unter Berücksichtigung der verschiedenen Entwicklungsstufen untersucht werden kann und gleichzeitig eine Differenzierung zwischen den retinalen Zelltypen möglich ist.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass alle retinalen Zelltypen im Verlauf der fetalen Entwicklung unterschiedliche globale Ausprägungen der untersuchten epigenetischen Mechanismen aufweisen. In Bezug auf die anderen untersuchten okulären Gewebestrukturen ließen sich keine zelltypspezifischen Besonderheiten feststellen, vielmehr zeigte sich an den jeweiligen Zelltypen ein einheitliches Färbungsmuster.

Durch die Entwicklung immer sensitiverer Nachweismethoden sind inzwischen sogar Einzelzelluntersuchungen möglich (Clark et al., 2016). Dabei zeigen sich Hinweise, dass sich das Epigenom auch zwischen einzelnen Zellen unterscheiden kann. Smallwood et al. (2014) konnten mittels Einzelzelluntersuchungen in murinen embryonalen Stammzellen

eine große Variabilität der DNA-Methylierung bestimmter genomischer Regionen zwischen einzelnen Zellen nachweisen. Ebenso lassen sich Unterschiede im Chromatin-Zustand zwischen einzelnen Zellen sowohl bei murinen als auch humanen Zellen aus Zellkulturen beobachten (Rotem et al., 2015). Untersuchungen sind diesbezüglich an der humanen Retina noch nicht durchgeführt worden. Eine Stärke der vorliegenden Studie liegt darin, dass mittels der Immunhistochemie ebenfalls die Betrachtung einzelner Zellen ermöglicht wird. Es konnte in allen untersuchten okulären Strukturen nachgewiesen werden, dass sich die Ausprägung der analysierten epigenetischen Marker zwischen einzelnen Zellen unterscheiden kann. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen damit die Hypothese, dass das Epigenom zwischen einzelnen Zellen variieren kann.

4.1.1 Gemeinsamkeiten der Ganglienzellen und amakrinen Zellen

Die Kerne der Ganglienzellen und amakrinen Zellen zeigten bei allen verwendeten Antikörpern häufig einen identischen Grad der Färbung, was auf ähnliche globale Modifikationen des Epigenoms schließen lässt. Gleichzeitig verhielten sich diese beiden Zelltypen in Bezug auf das Färbungsverhalten häufig gegensätzlich zu den übrigen Zelltypen. Während der Entwicklung der Retina besteht eine enge Assoziation zwischen amakrinen Zellen und Ganglienzellen, wobei die amakrinen Zellen eine modulierende Wirkung auf die Ganglienzellen ausüben (Lipton et al., 1988).

Während der fetalen Entwicklung lassen sich in den Ganglienzellen spontane elektrische Impulse nachweisen (Wong und Oakley, 1996). Es wird angenommen, dass diese Reize wesentlich zur Ausbildung von regelrechten synaptischen Verschaltungen in der Retina beitragen (Kalil, 1990). Zhou (1998) konnte nachweisen, dass diese Signale teilweise auf der Signalübertragung von sogenannten Starburst-Zellen, einer Unterpopulation von amakrinen Zellen, beruhen. Die Zellkörper dieser Subpopulation befinden sich teils in der GCL, teils in der INL und gehören zu den cholinergen Amakrinzellen (Rodieck, 1989). Insgesamt können mehr als 60 verschiedene Arten von amakrinen Zellen unterschieden werden (Egger und Diamond, 2020). Laut Hoshino et al. (2017) kommt es um die 11. SSW zu einem Anstieg der Expression von Synapsen-assoziierten Genen, welche die Autoren am ehesten auf die beginnende Synaptogenese zwischen Ganglienzellen und amakrinen Zellen zurückführen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die cholinerge Wirkung, die von den amakrinen Zellen ausgeht, einen Einfluss auf die Differenzierung umgebener

Zellen über eine Veränderung der intrazellulären Calciumspiegel nimmt (Wong, 1995). Im Gegensatz zu den übrigen retinalen Zelltypen, bei denen muskarinerge Acetylcholinrezeptoren an der Signalübertragung beteiligt sind, werden in Ganglien- und amakrinen Zellen die Effekte des Acetylcholins über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt (Wong, 1995). Es wurde belegt, dass sowohl für Ganglienzellen als auch amakrine Zellen die Regulierung der Bildung von Zellfortsätzen zu einem wesentlichen Anteil auf den Einfluss des Acetylcholins zurückzuführen ist (Lipton et al., 1988; Wong, 1995).

4.1.2 Gemeinsamkeiten Müllerzellen mit Ganglienzellen und Amakrinzellen

Ähnlich wie zwischen den Ganglienzellen und amakrinen Zellen zeigten auch die Müllerzellen bei allen untersuchten epigenetischen Markern häufig einen vergleichbaren Färbungsgrad mit den amakrinen Zellen und Ganglienzellen, jedoch in geringerer Ausprägung. Auch bei den Müllerzellen lässt sich ein entwicklungsbiologischer Zusammenhang mit den amakrinen Zellen nachweisen. In der murinen Retina konnten Rosa et al. (2015) feststellen, dass der intrazelluläre Calciumspiegel von Müllerzellen ebenfalls durch den Einfluss cholinerg amakriner Zellen beeinflusst wird. Zhang et al. (2019) konnten außerdem beobachten, dass spontane elektrische Impulse, die sich während der Entwicklung in der Retina manifestieren, auch in den Müllerzellen von Mäusen nachzuweisen sind und dass diese Impulse sogar von den Müllerzellen selbst moduliert werden können.

4.2 Zusammenhang zwischen Alter und globalem Epigenom

In dieser Studie wurde eine Abnahme des Farbscores in Abhängigkeit vom Gestationsalter für jeden Antikörper festgestellt. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten epigenetischen Marker mit zunehmendem Alter global herunterreguliert werden. Die Intensität der Abnahme schwankte je nach Antikörper und betrachteter okulärer Struktur. Eine negative Korrelation zwischen Farbscore und Alter konnte bei allen untersuchten Strukturen beobachtet werden, wobei nicht alle Fälle statistisch signifikant waren. Aufgrund der mit 34 Präparaten moderaten Kohortengröße und des gleichförmigen Ergebnisses kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei einer größeren Stichprobe auch die übrigen Fälle eine signifikante Abnahme gezeigt hätten.

Präparate mit einem ähnlichen Alter zeigten häufig ein identisches Färbungsmuster an den verschiedenen retinalen Zelltypen, während Präparate aus anderen Altersstufen ein

divergierendes Muster aufwiesen. Die Beobachtung, dass die untersuchten epigenetischen Modifikationen der jeweiligen Zelltypen in ihrer Ausprägung stark zwischen den Altersstufen schwankten, bestätigt die Annahme, dass epigenetische Faktoren einem dynamischen Wandel unterliegen (Corso-Díaz et al., 2018; Cvekl und Mitton, 2010; Raeisossadati et al., 2021). Präparate aus derselben Altersstufe präsentierten allerdings nicht in allen Fällen ein ähnliches Muster der Färbung. Die Einteilung der Alterszeiträume in Wochen führt dazu, dass verschiedene Präparate aus einer Altersstufe in ihrem Entwicklungsstatus um mehrere Tage variieren können, was möglicherweise die divergierenden Färbungsmuster erklärt. Laut Hendrickson (2016) kann zudem der Entwicklungsfortschritt eines Feten um bis zu zwei Wochen variieren.

Da das Verhalten der epigenetischen Modifikationen auch innerhalb einer Altersstufe sehr heterogen ausfallen kann, ist es möglich, dass neben unterschiedlichen Entwicklungszuständen auch individuelle Faktoren die Differenzen der untersuchten epigenetischen Modifikationen erklären. Es ist bekannt, dass sich das Epigenom interindividuell unterscheidet, selbst bei eineiigen Zwillingen mit identischem Genom (Gordon et al., 2012). Insofern stehen die gewonnenen Erkenntnisse in Einklang mit dieser Studie. Teilweise zeigten sich innerhalb derselben Altersstufe Präparate mit großen Differenzen untereinander, was auf einen signifikanten Einfluss von individuellen Faktoren schließen lässt. Potentielle methodenbedingte Differenzen zwischen einzelnen Präparaten scheinen als Ursache für divergierende Färbungsmuster unwahrscheinlich, da jeder Arbeitsschritt in einem Färbungsprotokoll exakt definiert wurde, um so ein standardisiertes Vorgehen während der Anfertigung der immunhistochemischen Präparate zu gewährleisten.

Die größten Schwankungen des Färbungsmusters wurden in der vorliegenden Studie während der frühen und mittleren Fetalperiode festgestellt. In dieser Zeitperiode waren Veränderungen der globalen Methylierungs- und Acetylierungsmuster immunhistochemisch nachweisbar. Während der späten Fetalperiode waren die Veränderungen des Färbungsmusters an den retinalen Zellen weniger ausgeprägt, was auf eine gewisse Angleichung des Epigenoms mit zunehmendem Alter hinweist. Passend dazu konnten mittels RNA-Sequenzierung während der retinalen Entwicklung drei bedeutende Zeitfenster identifiziert werden, in denen das Genexpressionsmuster Veränderungen unterliegt (Hoshino et al., 2017; Mellough et al., 2019). Etwa zwischen der 5. bis zur 20. SSW findet dabei ein Wandel von Genen, die für Proliferationsvorgänge relevant sind, hin zu Genen statt, die

für Differenzierungsvorgänge bedeutsam sind (Hoshino et al., 2017; Mellough et al., 2019). Gleichzeitig kommt es zu einem Wechsel der vorherrschenden Transkriptionsfaktoren, je nachdem, welche Zellen sich gerade in den entsprechenden Entwicklungs- oder Differenzierungsstadien befinden (Hoshino et al., 2017; Mellough et al., 2019). Da sich die verschiedenen retinalen Zelltypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entwickeln, liegen hier also unterschiedliche Transkriptome der retinalen Zellen vor. Des Weiteren ließ sich feststellen, dass in frühen Entwicklungsphasen das Expressionsmuster weitaus heterogener ausfiel als in späteren Entwicklungsphasen (Hoshino et al., 2017; Mellough et al., 2019). Diese Erkenntnisse sind kongruent mit den Ergebnissen, die sich aus den immunhistochemischen Färbungen ziehen lassen, da hier die differenten Muster in den Färbungen ebenfalls in den frühen Abschnitten vorherrschend waren, während in den Präparaten aus späteren Entwicklungsphasen eher ein homogeneres Muster zu beobachten war. Eine Schwäche der Studien von Hoshino et al. (2017) und Mellough et al. (2019) liegt darin, dass bei der RNA-Sequenzierung die gesamte Retina verwendet wurde; Veränderungen der Transkriptome einzelner Zellen können also durch die Transkriptome anderer Zellen maskiert werden. Die Immunhistochemie bietet hier den Vorteil, die einzelnen Zelltypen differenzieren zu können. Zu beachten ist, dass Veränderungen des Transkriptoms nicht zwangsläufig mit Veränderungen im Epigenom einhergehen, da zwischen beiden Zuständen nur ein indirekter Zusammenhang besteht und die vorliegende Studie nicht das Transkriptom der retinalen Zellen untersucht hat.

4.3 Zusammenhang zellulärer Differenzierungsgrad und Epigenom

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der Status der epigenetischen Modifikationen vom zellulären Entwicklungsstand abhängig ist. Dies wird unter anderem in den Präparaten der frühen Fetalperiode deutlich, in denen noch zahlreiche Zellkerne undifferenzierter Zellen vorhanden waren. Die runden Zellkerne der bereits in zunehmendem Maße differenzierten Zellen wiesen eine stärkere Farbtintensität und damit ein höheres Maß an Histon-Acetylierungen bzw. einen höheren Grad an Methylierungen und Hydroxymethylierungen der DNA auf. Da für verschiedene zelluläre Organisationszustände unterschiedliche Gene benötigt werden, wird die Genexpression durch epigenetische Mechanismen mitgesteuert. Aldiri et al. (2017) konnten nachweisen, dass sich die Genexpression von proliferativen und differenzierten Zellen signifikant unterscheidet. Die

Autoren konnten belegen, dass mit steigendem Gestationsalter die Expression von proliferativ wirkenden Genen abnimmt, während Gene, die für Differenzierungsvorgänge eine wichtige Rolle spielen, vermehrt exprimiert werden (Aldiri et al., 2017). Insofern passen diese Resultate zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

In dieser Studie konnte die zentrifugale Differenzierung der Retina gut nachvollzogen werden. Der unterschiedliche Entwicklungsfortschritt zwischen der zentralen und peripheren Retina zeigte sich eindeutig und gewährleistete eine klare Abgrenzung zwischen diesen Bereichen. Bedingt durch die zentrifugale Differenzierung ließen sich in jedem Präparat unterschiedliche Differenzierungsstufen der retinalen Zellen beobachten. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten für alle untersuchten epigenetischen Modifikationen mögliche Unterschiede zwischen der Anfärbung der Zellkerne von zentraler und peripherer Retina. Interessanterweise wurden diese Unterschiede mit zunehmendem Alter seltener und weniger ausgeprägt, wenn eine Angleichung der Differenzierungszustände zwischen zentraler und peripherer Retina eintrat. In dieser Studie ließen sich bis zur 26. SSW noch bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Retina-Bereichen nachweisen, während in den Präparaten älterer Augen nur noch marginale Abweichungen vorhanden waren.

Da die meisten Studien die Retina als Ganzes verwenden, können Unterschiede in der Genexpression oder im Epigenom zwischen zentraler und peripherer Retina maskiert werden. Verschiedene Autoren konnten unter Berücksichtigung dieser divergenten Differenzierungsstadien nachweisen, dass sich das Transkriptom der humanen fetalen Retina zwischen den zentralen und peripheren Bereichen der Retina deutlich unterscheidet (Hoshino et al., 2017; Li et al., 2014). Die Genexpressionsmuster der zentralen Retina lassen sich dabei zeitversetzt auch in der peripheren Retina nachweisen (Hoshino et al., 2017; Li et al., 2014). Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionsmuster der peripheren Retina erst 50 Tage nach denen der zentralen Retina erreicht werden (Hoshino et al., 2017; Quinn und Wijnholds, 2019).

4.4 Bedeutung epigenetischer Faktoren während der Fetalperiode

4.4.1 Rolle von Histonmodifikationen in der retinalen Entwicklung

Die Ausprägung von Histonmodifikationen ist ein dynamischer Prozess, welcher sich temporär auf veränderte Bedürfnisse der Genexpression anpassen kann. Mo et al. (2016) konnten dementsprechend nachweisen, dass Acetylierungen in Startregionen bestimmter aktiv transkribierter Gene in undifferenzierten retinalen Zellen in höherem Maße ausgeprägt sind als in differenzierten Photorezeptorzellen. Die eigenen Daten zeigten eine Abnahme der Acetylierung von Histonproteinen mit zunehmendem Gestationsalter und unterstützen somit die Ergebnisse dieser Studie. Die Rolle der Acetylierung von Histonproteinen bei der Entwicklung retinaler Zellen wurde insbesondere für die Photorezeptorzellen in unterschiedlichen Studien evaluiert. Dass die Acetylierung von Histonen eine wichtige Rolle für die Initiation der Differenzierungsvorgänge von retinalen Progenitorzellen hin zu Photorezeptorzellen spielt, konnte in unterschiedlichen Studien nachgewiesen werden (Ferreira et al., 2017; Hennig et al., 2013; Kim et al., 2012; Raeisossadati et al., 2021). Die am häufigsten eingesetzte Methode zur genomweiten Untersuchung von Histonmodifikationen stellt die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) dar. Dabei wird das isolierte Chromatin mit Antikörpern, meist gegen Modifikationen des Histonproteins H3, inkubiert. Anschließend wird die DNA in ein bis zwei Nukleosomen große Abschnitte fragmentiert, die an Antikörper gebundenen DNA-Fragmente können dann mithilfe unterschiedlicher Verfahren weiter prozessiert werden. Zur Ermittlung des globalen Status der Histonmodifikationen stehen dabei das ChIP-on-Chip-Verfahren oder das Chromatin-Immunoprecipitation-DNA-Sequencing-Verfahren (ChIPseq-Verfahren) zur Verfügung (Mellor et al., 2008). Bei dem ChIP-on-Chip-Verfahren wird die Immunpräzipitation mit einer Hybridisierung auf einem DNA-Microarray kombiniert, je nach Wahl des Microarrays kann der Fokus auf unterschiedliche genomische Steuerungselemente wie Promotoren oder Repressoren gelegt werden (Buck und Lieb, 2004). Bei der ChIPseq-Methode wird die gewonnene DNA unmittelbar sequenziert (Furey, 2012). Einschränkungen in der Aussagekraft dieser Methoden bestehen insbesondere darin, dass in der Praxis häufig nur wenige Modifikationen am Histonprotein H3 ausgewertet werden, da für die parallele Untersuchung weiterer Modifikationen eine sehr hohe Anzahl an intakten Zellen benötigt

werden würde. Mit der Immunhistochemie lässt sich zwar nicht der Grad der Acetylierungen an bestimmten genomischen Regionen ermitteln, allerdings gelingt hier eine Analyse am intakten Gewebekomplex, um so insbesondere die räumliche Verteilung der Modifikationen innerhalb der jeweiligen Gewebestruktur zu erfassen. Dieser Aspekt lässt sich mit anderen üblichen Verfahren zur Untersuchung epigenetischer Modifikationen, wie der ELISA, der PCR oder Sequenzierungsmethoden, nicht erfassen.

4.4.2 Rolle der DNA-Methylierung in der retinalen Entwicklung

Die bisherigen Forschungsergebnisse legen nahe, dass die Regulation der DNA-Methylierung eine kritische Rolle bei der retinalen Entwicklung spielt. Tierversuche zeigen eine Korrelation zwischen dem Funktionsverlust verschiedener DNMT-Enzyme und retinalen Fehlbildungen, darunter fehlerhafte Differenzierungen, Dysfunktionen retinaler Zellen sowie Störungen des retinalen Schichtaufbaus (Angileri und Gross, 2020; Rai et al., 2006; Rai et al., 2007; Rai et al., 2010; Rhee et al., 2012; Singh et al., 2017). Um die Bedeutung der DNA-Methylierung bei der Regulation retinaler Transkriptionsfaktoren zu verdeutlichen, untersuchten Berdasco et al. (2017) die Genregionen von 55 Transkriptionsfaktoren, die bei der retinalen Entwicklung eine wesentliche Rolle spielen. In adultem retinalen Gewebe zeigte sich bei einem Großteil dieser Transkriptionsfaktoren eine Hypermethylierung in den Promotorbereichen. Während der frühen retinalen Entwicklung ließ sich dagegen bei einigen Transkriptionsfaktoren, u.a. PAX6, eine Hypomethylierung der Promotorregionen identifizieren, die auch mit einer erhöhten Expression des entsprechenden Transkriptionsfaktors einhergeht. In dieser Studie wurde das Infinium Illumina HumanMethylation 450K BeadChip-Verfahren genutzt, mit dem sich die Methylierung einzelner Gene beurteilen lässt. Obwohl in dieser Studie an einzelnen wichtigen Transkriptionsfaktoren in der frühen Entwicklung eine Hypomethylierung festgestellt werden kann, sind diese Ergebnisse nicht repräsentativ in Bezug auf die globale DNA-Methylierung.

Aldiri et al. (2017) konnten bezüglich der globalen DNA-Methylierung in der Retina während der fetalen Entwicklung keine globale Abnahme beobachten. Ähnliche Beobachtungen ließen sich auch in anderen Gewebearten während der Fetalperiode machen (Sliker et al., 2015; Spiers et al., 2015). Laut Berdasco et al. (2017) liegt der Grad der Methylierung von Cytosinbasen in adulten Augen zudem auf einem hohen Niveau. Damit stehen

diese Ergebnisse in Kontrast zu den Resultaten aus unserer Studie. Zwar konnte in adultem Gewebe immunhistochemisch ebenfalls eine hohe Ausprägung der globalen Methylierung gezeigt werden, gleichzeitig ließ sich jedoch während der Fetalperiode eine Abnahme der Methylierung beobachten. Eine mögliche Erklärung könnte in der unterschiedlichen Methodik liegen.

Die am weitesten verbreitete Methode zur Analyse der DNA-Methylierung stellt die Bisulfit-Sequenzierung dar. Dieser Prozess beinhaltet die Umwandlung von nicht-methylierten Cytosinbasen in Uracil, während modifizierte Cytosinbasen nicht katalysiert werden und somit als modifizierte Basen in der Sequenzierung detektiert werden können. Mit dieser Methode kann eine genomweite Bisulfit-Sequenzierung erfolgen. Alternativ können auch nur repräsentative Bereiche des Genoms durch die sogenannte Reduced representation bisulfite sequencing-Methode untersucht werden. Mit dieser Methode kann der Methylierungszustand genomischer Regionen präzise erfasst werden. Eine Einschränkung besteht darin, dass nicht zwischen 5mC und 5hmC unterschieden werden kann. Ein Vorteil der Immunhistochemie liegt darin, dass bei Verwendung der entsprechenden Antikörper eine Differenzierung zwischen 5mC und 5hmC möglich ist.

4.4.3 Rolle der DNA-Hydroxymethylierung in der retinalen Entwicklung

Über die Bedeutung dieser Base während der okulären Entwicklung ist nur wenig bekannt, Untersuchungen an Zebrafischen geben allerdings Hinweise darauf, dass eine gestörte Funktion der TET-Enzyme, welche die Bildung von 5hmC aus 5mC katalysieren, zu Dysfunktionen retinaler Zellen führt (Seritrukul und Gross, 2017). Die Autoren konnten zudem eine unterschiedlich starke Expression der TET-Enzyme in den verschiedenen retinalen Schichten nachweisen, mit einer stärkeren Expression in der GCL und der INL und einer schwächeren Expression in der ONL (Seritrukul und Gross, 2017). Diese Ergebnisse lassen sich mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie in Einklang bringen, hier zeigte sich sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Retina immunhistochemisch eine durchschnittlich höhere Konzentration von 5hmC in der GCL und der INL als in der ONL. Die stärkste Korrelation zwischen Alter und Farbscore ergab sich bei den Färbungen mit dem Antikörper Anti-5hMeC, was nahelegt, dass der Anteil von 5hmC im Genom während der fetalen Entwicklung deutlich abnimmt. In der Literatur ist beschrieben, dass der Anteil an 5hmC während der Embryonalphase in humanen und murinen Stammzellen auf einem

hohen Niveau liegt und mit zunehmender Differenzierung abnimmt (Ruzov et al., 2011). Insofern stehen die Resultate der immunhistochemischen Färbungen im Einklang mit diesen Ergebnissen.

Bei den Färbungen mit dem Antikörper Anti-5hmC zeigte sich teilweise eine deutliche Hintergrundfärbung. Dies könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, dass die Base 5hmC nicht singular im Zellkern lokalisiert ist, sondern auch Bestandteil der mitochondrialen DNA ist (Shock et al., 2011). In der vorliegenden Studie ließ sich bei den sonstigen Antikörpern dagegen keine wesentlich ausgeprägte Hintergrundfärbung feststellen.

4.4.4 Rolle der Epigenetik in der Kornea

Bonnin et al. (2014) konnten mittels RNA-Analysen an adultem Gewebe nachweisen, dass sich die Genexpression der DNMT-Enzyme zwischen Kornea, Konjunktiva, Linsenkapsel und Trabekelwerk unterscheidet. Die Autoren konnten in der Kornea alle Formen der DNMT-Enzyme nachweisen, wobei das Enzym DNMT3B nur in geringem Maße vorhanden war. Laut Bonnin et al. (2014) deuteten immunhistochemische Färbungen darauf hin, dass das Enzym DNMT2 vor allem im Endothel der Kornea zu finden war, während die übrigen DNMT-Enzyme eher im kornealen Epithel lokalisiert waren. In der vorliegenden Studie ließen sich keine Unterschiede in Bezug auf die globale DNA-Methylierung zwischen den verschiedenen Bereichen der Kornea beobachten. Anzumerken ist hierbei, dass das Enzym DNMT2 zwar große strukturelle Ähnlichkeiten mit den übrigen DNMT-Enzymen aufweist, aber nicht die Fähigkeit zur DNA-Methylierung besitzt (Goll et al., 2006). Das Enzym DNMT2 bewirkt die Methylierung der Transfer-RNA von Asparaginsäure und wird daher auch tRNA aspartic acid methyltransferase 1 genannt (Tuorto et al., 2012).

4.4.5 Rolle der Epigenetik im Kammerwinkel

Ebenso wie für die anderen okulären Strukturen mit Ausnahme der Retina ist der Kammerwinkel bisher kaum in der epigenetischen Forschung berücksichtigt worden. Eine Literaturrecherche über die Datenbank PubMed im Februar 2025 mit den Begriffen „chamber angle AND epigenetic“ resultierte lediglich in drei Ergebnissen, die keine weiterführenden Hinweise auf die untersuchten epigenetischen Mechanismen lieferten. Ein beson-

deres Ergebnis in Bezug auf den Kammerwinkel, welches sich aus der vorliegenden Studie ableiten lässt, ist, dass sich die höchste Korrelation zwischen Ausprägung des Farbscores und Gestationsalter bei allen Antikörper-Färbungen im Kammerwinkel zeigte. Auch wenn die Daten zur Epigenetik des Kammerwinkels während der Fetalperiode in der Literatur begrenzt sind, finden im Kammerwinkel adulter Augen epigenetische Prozesse statt. Die Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen deuten darauf hin, dass das Glaukom mit Veränderungen des Epigenoms der Zellen im Trabekelmaschenwerk einherzugehen scheint. McDonnell et al. (2016) konnten in ihrer Studie bestätigen, dass die globale DNA-Methylierung in Zellen des Trabekelmaschenwerks von Patienten mit einer Glaukomerkrankung auf einem höheren Niveau liegt als bei gesunden Kontrollpersonen. Als maßgeblicher Grund wird dabei eine Hypoxie im Trabekelmaschenwerk angenommen, welche beim Glaukom beobachtet werden kann (McDonnell et al., 2016). Es ist bekannt, dass eine Hypoxie in verschiedenen Gewebearten eine Hypermethylierung der DNA verursachen kann, etwa in der Prostata oder in Myokardzellen (Watson et al., 2009; Watson et al., 2014). Die Autoren konnten nachweisen, dass auch die Zellen des Trabekelmaschenwerks von gesunden Kontrollpersonen unter hypoxischen Bedingungen ein ähnliches Methylierungsmuster der DNA aufweisen wie in den entsprechenden Zellen von glaukomatösen Augen (McDonnell et al., 2016). Inwieweit eine Hypoxie bei den Augen der vorliegenden Studie vorlag und damit möglicherweise Einfluss auf die Methylierungsmuster nimmt, wurde nicht untersucht.

4.4.6 Rolle der Epigenetik in der Aderhaut

Ähnlich wie in den übrigen okulären Strukturen mit Ausnahme der Retina ließ sich in der Aderhaut ein homogenes Muster in Bezug auf die Färbung erkennen, ohne Unterschiede zwischen Zelltypen oder Organabschnitten. Bezüglich der Aderhaut lassen sich in der Literatur keine Angaben über die Epigenetik während der fetalen Entwicklung finden. Interessanterweise liegt ein hoher Anteil von 5hmC in den Melanozyten der Chorioidea vor (Pomerleau et al., 2021). Im Rahmen dieser Studie ließ sich dieser hohe Anteil allerdings immunhistochemisch nicht durch einen höheren Grad des Farbscores in der Chorioidea nachvollziehen. Gleichzeitig liegt der Anteil von 5mC in der Aderhaut nach Pomerleau et al. (2021) in einem unterdurchschnittlichen Bereich mit lediglich 0,5 Prozent aller Nukle-

inbasen. In der vorliegenden Studie wurde keine Korrelation zwischen dem niedrigen Anteil von 5mC und einem niedrigeren Farbscore in der Chorioidea mittels immunhistochemischer Untersuchungen nachgewiesen.

4.5 Interaktion zwischen den epigenetischen Mechanismen

Die positive Korrelation des Farbscores bei allen Antikörper-Paaren lässt vermuten, dass sich die Ausprägung der untersuchten epigenetischen Mechanismen im globalen Sinne gleichsinnig verhält. Insbesondere die Acetylierung der Histonproteine H3 und H4 zeigte eine hohe Korrelation. Da die Acetylierung an beiden Proteinen einen identischen Effekt auf den Status des Chromatins besitzt und in einer Dekondensation des Chromatins resultiert, ist dieses Ergebnis plausibel.

Das in dieser Studie festgestellte positive Verhältnis zwischen der Methylierung von Cytosinbasen und der Acetylierung von Histonen erscheint zunächst paradox, da beide Mechanismen im Allgemeinen einen konträren Einfluss auf die Genexpression haben. In verschiedenen bisherigen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen einer Hypermethylierung der DNA und einer Hypoacetylierung von Histonproteinen aufgezeigt werden (Eden et al., 1998; Hashimshony et al., 2003). Die Methylierung von CpG-Dinukleotiden führt zu einer Aktivierung von Histon-Deacetylasen, was sich mit einer verminderten Transkription vereinbaren lässt (Hashimshony et al., 2003; Jones et al., 1998). In Einklang mit diesem Konzept konnte eine Assoziation zwischen Bereichen mit hypomethylierten Cytosinbasen und hyperacetylierten Histonproteinen ausgemacht werden (Hon et al., 2013; Mo et al., 2015). Die Zusammenhänge zwischen DNA-Methylierung, Acetylierung von Histonproteinen und Genexpression folgen allerdings nicht rigide diesem Schema, sondern sind weitaus komplexer. Die Methylierung von Cytosinbasen im Promotorbereich eines Gens geht zwar im Allgemeinen mit einer reduzierten Transkription einher. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Hypermethylierung in den intragenen Bereichen jenseits der Initialregion positiv mit einer aktiven Transkription korreliert (Jones, 1999). Unter Berücksichtigung der damit assoziierten Acetylierung von Histonproteinen ist also durchaus eine Hypermethylierung der DNA mit einer Hyperacetylierung von Histonproteinen vereinbar.

Hon et al. (2013) sowie Mo et al. (2016) konnten unter anderem in Photorezeptorzellen

nachweisen, dass im Genom Bereiche mit einer Hypomethylierung der DNA und hypoacetylierten Histonproteinen existieren. Diese Genbereiche unterliegen während der Embryonalentwicklung einer aktiven Transkription, können aber in der späteren Entwicklung aufgrund des in hohem Maße kondensierten Chromatins nicht mehr transkribiert werden (Hon et al., 2013; Mo et al., 2016).

Die oben angeführten Studien belegen, dass die Interaktionen zwischen der Acetylierung von Histonproteinen und DNA-Methylierung äußerst komplex sind. Mithilfe der in dieser Studie verwendeten Antikörper zur immunhistochemischen Färbung ließ sich der globale Status von epigenetischen Modifikationen untersuchen, es können jedoch keine Aussagen über die räumliche Verteilung der epigenetischen Marker innerhalb des Genoms getroffen werden. Ebenso ist keine Aussage darüber möglich, ob die untersuchten Merkmale im jeweiligen Präparat in Zusammenhang stehen oder ihre Wirkung unabhängig voneinander entfalten.

Die Base 5hmC konnte sowohl in murinem als auch humanem fetalen Gewebe in Zusammenhang mit einer aktiven Transkription und aktivierenden Histon-Markierungen gefunden werden (Ficz et al., 2011; Lister et al., 2013). Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Korrelation zwischen der globalen Ausprägung von 5mC und 5hmC konnte in dieser Form bisher nicht festgestellt werden (Nestor et al., 2012). Die Ergebnisse der Studie von Nestor et al. (2012) wurden allerdings an humanen Proben von adultem Gewebe erhoben und sind daher nicht unmittelbar auf fetales retinales Gewebe übertragbar.

4.6 Geschlechtsabhängigkeit des Epigenoms

Durch das ausgeglichene Geschlechterverhältnis der Kohorte bestand eine gute Vergleichbarkeit eventueller geschlechtsspezifischer Unterschiede. Es konnten signifikante Differenzen im epigenetischen Status zwischen männlichen und weiblichen Feten festgestellt werden. Statistisch ergab sich dabei unter Einbeziehung aller Strukturen für die jeweiligen Antikörper eine mittlere Effektstärke mit einem η^2 -Wert von 0,03 – 0,04 (Cohen, 1988). Bei separater Betrachtung der einzelnen okulären Strukturen zeigte sich allerdings nur in zwei Fällen ein statistisch signifikantes Ergebnis. Es ist anzunehmen, dass die Kohorte nicht ausreichend groß war, um bestehende Unterschiede zwischen spezifischen okulären Gewebearten festzustellen. Ergebnisse von anderen Autoren bestätigen, dass Unterschiede des Epigenoms zwischen männlichen und weiblichen Individuen bestehen.

So konnten Abweichungen zwischen der Expression von Genen autosomaler Chromosomen festgestellt werden (Isensee und Ruiz Noppinger, 2007; Rinn und Snyder, 2005; Wijchers und Festenstein, 2011). Diese Unterschiede unterliegen in vielen Fällen keiner Kontrolle durch Geschlechtshormone, sondern lassen sich durch verschiedene Chromatinzustände und DNA-Methylierungsmuster erklären (Wijchers und Festenstein, 2011).

5. Zusammenfassung

In den letzten Jahren gewann die Epigenetik als Teilgebiet der molekulargenetischen Forschung zunehmend an Bedeutung. Bislang ist jedoch nur relativ wenig über epigenetische Veränderungen während der Entwicklung des menschlichen Auges bekannt. Im Rahmen dieser Studie wurde die globale Ausprägung verschiedener epigenetischer Marker während der fetalen Entwicklung des menschlichen Auges untersucht. Dazu wurden 34 humane fetale Augen aus der 11. bis 38. Gestationswoche mittels immunhistochemischer Färbungen auf globale Modifikationen, sowohl von Histon 3 und 4 als auch der DNA-Methylierung und DNA-Hydroxymethylierung, untersucht.

In allen betrachteten okulären Strukturen konnten die untersuchten Marker nachgewiesen werden. Die nukleäre Färbintensität von Kornea, Kammerwinkel, Aderhaut und Retina wurde mittels eines Scores aus dem Anteil der angefärbten Zellkerne und der Intensität der Färbung bestimmt. Besondere Berücksichtigung erhielt die Retina; hier wurden zentrale und periphere Bereiche sowie die einzelnen Netzhautschichten separat betrachtet. Die Ergebnisse zeigen sowohl für Histonmodifikationen als auch für die globale Methylierung und Hydroxymethylierung von DNA-Basen eine signifikante Abnahme des Scores mit zunehmendem Gestationsalter. Dies lässt auf eine vermehrte Aktivität epigenetischer Prozesse in frühen Entwicklungsphasen mit sukzessiver Abnahme im weiteren Verlauf der Entwicklung schließen. Die Auswertung der Retina zeigt, dass epigenetische Prozesse nicht in der gesamten Retina in gleichem Maße auftreten; vielmehr finden sich erhebliche Differenzen sowohl zwischen zentralen und peripheren Bereichen als auch zwischen den retinalen Schichten und Zelltypen.

Diese Untersuchung zeigt erstmals lokalisationspezifisch okuläre epigenetische Veränderungen an humanen Augen über nahezu die gesamte Fetalperiode. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass epigenetische Veränderungen während der fetalen Entwicklung insbesondere in der Retina einem komplexen Muster folgen. Bei der zukünftigen Betrachtung der Retina als Forschungsobjekt der Epigenetik sollte daher berücksichtigt werden, dass sich diese hinsichtlich der epigenetischen Entwicklung als heterogenes Gewebe darstellt und die einzelnen Zelltypen separat betrachtet werden müssen. Die in der Studie gewonnenen Erkenntnisse liefern darüber hinaus Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen, um die epigenetischen Prozesse zukünftig noch präziser zu charakterisieren.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Embryologischer Ursprung okulärer Gewebestrukturen	8
Abbildung 2: Beispielhafte Darstellung der Kornea in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (13. SSW (A-C), 23 SSW. (D-F), HE-Färbung)	11
Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung des Kammerwinkels während der fetalen Entwicklung im Alter von 14 SSW (A, B) bzw. 19 SSW (C, D), HE-Färbung	12
Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Aderhaut während der fetalen Entwicklung im Alter von 17 SSW, HE-Färbung	13
Abbildung 5: Darstellung der Retina im Alter von 9 SSW	15
Abbildung 6: Darstellung der zunehmenden Differenzierung der Retina während der Fetalperiode im Alter von 13 (A), 15 (B) und 19 (C, D) Gestationswochen, HE-Färbung	16
Abbildung 7: Darstellung der Retina in der 25. SSW mit bereits adulter Konfiguration, HE-Färbung	17
Abbildung 8: Methylierung der Purinbase Cytosin	20
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Histon-Oktamers mit N-terminalen Aminosäuresequenzen	24
Abbildung 10: Altersverteilung innerhalb der untersuchten Kohorte	28
Abbildung 11: Beispielhafte Darstellung der immunhistochemischen Färbungen zur Erläuterung des Farbscores (Antikörper Anti-H4Ac) an der zentralen Retina	35

Abbildung 12: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der Kornea, dargestellt als Boxplots	41
Abbildung 13: Exemplarische Darstellung der Färbung der Kornea sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 400fache Vergrößerung	42
Abbildung 14: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore im Kammerwinkel, dargestellt als Boxplots	43
Abbildung 15: Exemplarische Darstellung der Färbung des Kammerwinkels sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 200fache Vergrößerung	44
Abbildung 16: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der Aderhaut, dargestellt als Boxplots	45
Abbildung 17: Exemplarische Darstellung der Färbung der Aderhaut sowie HE-Färbung in verschiedenen Entwicklungsstufen, 400fache Vergrößerung	46
Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore in der zentralen Retina, dargestellt als Boxplots	47
Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Gestationsalter und Farbscore, periphere Retina	48
Abbildung 20: Darstellung der höchsten und niedrigsten Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen epigenetischen Markern	51
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 12 SSW, zentrale Retina	54
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 12 SSW, zentrale Retina	54

- Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 13-14 SSW, Retina 55
- Abbildung 24: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 13-14 SSW, Retina 56
- Abbildung 25: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 13-14 SSW, Retina 56
- Abbildung 26: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 14 SSW, Retina 57
- Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 15-16 SSW, Retina 58
- Abbildung 28: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 15-16 SSW, Retina 59
- Abbildung 29: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 15-16 SSW, Retina 60
- Abbildung 30: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 15-16 SSW, Retina 60
- Abbildung 31: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 18 SSW, Retina 61
- Abbildung 32: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 17-18 SSW, Retina 62

- Abbildung 33: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 18 SSW, Retina 63
- Abbildung 34: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 17-18 SSW, Retina 64
- Abbildung 35: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 19 SSW, Retina 65
- Abbildung 36: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 19 SSW, Retina 65
- Abbildung 37: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 19 SSW, Retina 66
- Abbildung 38: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 19-20 SSW, Retina 67
- Abbildung 39: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 21-22 SSW, Retina 68
- Abbildung 40: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 22 SSW, Retina 69
- Abbildung 41: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 22 SSW, Retina 69
- Abbildung 42: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 21-22 SSW, Retina 70
- Abbildung 43: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 23 SSW, Retina 71

- Abbildung 44: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 23 SSW, Retina 72
- Abbildung 45: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 23 SSW, zentrale Retina 72
- Abbildung 46: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 23 SSW, periphere Retina 73
- Abbildung 47: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 26 SSW, zentrale Retina 73
- Abbildung 48: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 26 SSW, Retina 74
- Abbildung 49: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 26 SSW, Retina 75
- Abbildung 50: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 26 SSW, Retina 75
- Abbildung 51: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 32 SSW, Retina 76
- Abbildung 52: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 32 SSW, Retina 77
- Abbildung 53: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 32 SSW, Retina 77

- Abbildung 54: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 32 SSW, zentrale Retina 78
- Abbildung 55: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 34 SSW, Retina 79
- Abbildung 56: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 34 SSW, Retina 80
- Abbildung 57: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 34 SSW, Retina 80
- Abbildung 58: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 34 SSW, Retina 81
- Abbildung 59: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H3Ac im Alter von 38 SSW, Retina 82
- Abbildung 60: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-H4Ac im Alter von 38 SSW, Retina 83
- Abbildung 61: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5MeC im Alter von 38 SSW, Retina 84
- Abbildung 62: Exemplarische Darstellung der Färbung mit dem Antikörper Anti-5hMeC im Alter von 38 SSW, Retina 84

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kenndaten und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper	28
Tabelle 2: Score zur Bewertung des Anteils der gefärbten Zellkerne und der Farbintensität	35
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Geräte	37
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Reagenzien	38
Tabelle 5: Mittelwert der immunhistochemischen Färbung für die verschiedenen okulären Strukturen	39
Tabelle 6: Pearson-Korrelation von Alter und Farbscore bei Zusammenfassung aller okulären Strukturen	40
Tabelle 7: Pearson-Korrelation von Gestationsalter und Farbscore für jeden Antikörper in Abhängigkeit der okulären Struktur	40
Tabelle 8: Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen Antikörpern, bezogen auf alle okulären Strukturen	49
Tabelle 9: Korrelation des Farbscores zwischen verschiedenen Antikörpern, bezogen auf die einzelnen okulären Strukturen	50
Tabelle 10: Korrelation des Farbscores zwischen zentraler und peripherer Retina	52
Tabelle 11: Vergleich der Mittelwerte sowie Eta-Quadrat-Werte von männlichen und weiblichen Feten	52
Tabelle 12: Verteilung des Farbscores in den adulten Augen in ONL, INL und GCL	53

8. Literaturverzeichnis

Aldiri I, Xu B, Wang L, ..., Dyer MA. The Dynamic Epigenetic Landscape of the Retina During Development, Reprogramming, and Tumorigenesis. *Neuron* 2017; 94: 550-568.e10

Amato MA, Boy S, Perron M. Hedgehog signaling in vertebrate eye development: a growing puzzle. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 899–910

Amini R, Rocha-Martins M, Norden C. Neuronal Migration and Lamination in the Vertebrate Retina. *Front Neurosci* 2017; 11: 742

Angileri KM, Gross JM. dnmt1 function is required to maintain retinal stem cells within the ciliary marginal zone of the zebrafish eye. *Sci Rep* 2020; 10: 11293

Augustin AJ. *Augenheilkunde*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2001

Baba T, Grebe R, Hasegawa T, Bhutto I, Merges C, McLeod DS, Luty GA. Maturation of the fetal human choriocapillaris. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 3503–3511

Balazs EA, Toth LZ, Ozanics V. Cytological studies on the developing vitreous as related to the hyaloid vessel system. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 1980; 213: 71–85

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res* 2011; 21: 381–395

Barbisan F, Mazzucchelli R, Santinelli A, Stramazotti D, Scarpelli M, Lopez-Beltran A, Cheng L, Montironi R. Immunohistochemical evaluation of global DNA methylation and histone acetylation in papillary urothelial neoplasm of low malignant potential. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2008; 21: 615–623

Barishak YR. Embryology of the eye and its adnexa. Basel - Freiburg i. Br.: Karger, 2001

Berdasco M, Gómez A, Rubio MJ, ..., Esteller M. DNA Methylomes Reveal Biological Networks Involved in Human Eye Development, Functions and Associated Disorders. *Sci Rep* 2017; 7: 11762

Bhutani N, Burns DM, Blau HM. DNA demethylation dynamics. *Cell* 2011; 146: 866–872

Bibb LC, Holt JK, Tarttelin EE, Hodges MD, Gregory-Evans K, Rutherford A, Lucas RJ, Sowden JC, Gregory-Evans CY. Temporal and spatial expression patterns of the CRX transcription factor and its downstream targets. Critical differences during human and mouse eye development. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1571–1579

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6–21

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396–398

Bonnin N, Belville C, Chiambaretta F, Sapin V, Blanchon L. DNA methyl transferases are differentially expressed in the human anterior eye segment. *Acta Ophthalmol* 2014; 92: e366-71

Breton CV, Byun H-M, Wenten M, Pan F, Yang A, Gilliland FD. Prenatal tobacco smoke exposure affects global and gene-specific DNA methylation. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 462–467

Brune B, Brune T. Epigenetik: Einfluss auf die fetale Entwicklung. *Neonat Scan* 2017; 06: 51–70

Buck MJ, Lieb JD. ChIP-chip: considerations for the design, analysis, and application of genome-wide chromatin immunoprecipitation experiments. *Genomics* 2004; 83: 349–360

Campanero MR, Armstrong MI, Flemington EK. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6481–6486

Cedar H, Bergman Y. Programming of DNA methylation patterns. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 97–117

Chen T, Li E. Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Curr Top Dev Biol* 2004; 60: 55–89

Choudhuri S, Cui Y, Klaassen CD. Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245: 378–393

Clark SJ, Lee HJ, Smallwood SA, Kelsey G, Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol* 2016; 17: 72

Cohen J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. New York: Routledge 1988

Colbourne JK, Pfrender ME, Gilbert D, ..., Boore JL. The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science* 2011; 331: 555–561

Corso-Díaz X, Jaeger C, Chaitankar V, Swaroop A. Epigenetic control of gene regulation during development and disease: A view from the retina. *Prog Retin Eye Res* 2018; 65: 1–27

Cvekl A, Duncan MK. Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Prog Retin Eye Res* 2007; 26: 555–597

Cvekl A, Mitton KP. Epigenetic regulatory mechanisms in vertebrate eye development and disease. *Heredity* 2010; 105: 135–151

Daghsni M, Aldiri I. Building a Mammalian Retina: An Eye on Chromatin Structure. *Front Genet* 2021; 12: 775205

Davidsson J, Veerla S, Johansson B. Constitutional trisomy 8 mosaicism as a model for epigenetic studies of aneuploidy. *Epigenetics Chromatin* 2013; 6: 18

Dhouailly D, Pearton DJ, Michon F. The vertebrate corneal epithelium: from early specification to constant renewal. *Dev Dyn* 2014; 243: 1226–1241

Eden S, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H, Thorne AW. DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 1998; 394: 842

Egger V, Diamond JS. A17 Amacrine Cells and Olfactory Granule Cells: Parallel Processors of Early Sensory Information. *Front Cell Neurosci* 2020; 14: 600537

Eghrari AO, Riazuddin SA, Gottsch JD. Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015; 134: 7–23

Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 2709–2721

Feil R, Fraga MF. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 97–109

Ferreira RC, Popova EY, James J, Briones MRS, Zhang SS, Barnstable CJ. Histone Deacetylase 1 Is Essential for Rod Photoreceptor Differentiation by Regulating Acetylation at Histone H3 Lysine 9 and Histone H4 Lysine 12 in the Mouse Retina. *J Biol Chem* 2017; 292: 2422–2440

Ficz G, Branco MR, Seisenberger S, Santos F, Krueger F, Hore TA, Marques CJ, Andrews S, Reik W. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature* 2011; 473: 398–402

Franklin TB, Mansuy IM. Epigenetic inheritance in mammals: evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiol Dis* 2010; 39: 61–65

French D, Edsall JT. The Reactions of Formaldehyde with Amino Acids and Proteins. *Adv Protein Chem* 1945; 2: 277–335

Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; 278: 4035–4040

Furey TS. ChIP-seq and beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 840–852

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 1987; 196: 261–282

Gemenetzi M, Lotery AJ. The role of epigenetics in age-related macular degeneration. *Eye* 2014; 28: 1407–1417

Globisch D, Münzel M, Müller M, Michalakis S, Wagner M, Koch S, Brückl T, Biel M, Carell T. Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PloS one* 2010; 5: e15367

Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2009; 5: 401–408

Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh C-L, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 2006; 311: 395–398

Gordon L, Joo JE, Powell JE, ..., Saffery R. Neonatal DNA methylation profile in human twins is specified by a complex interplay between intrauterine environmental and genetic factors, subject to tissue-specific influence. *Genome Res* 2012; 22: 1395–1406

Gowher H, Jeltsch A. Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Biochem Soc Trans* 2018; 46: 1191–1202

Graumann W, Sasse D. *Compact Lehrbuch Anatomie*. Stuttgart: Schattauer, 2014

Graw J. *Genetik*. Berlin - Heidelberg: Springer Spektrum, 2015

Haaf T. Epigenetische Genomreprogrammierung in der Keimbahn und im frühen Embryo: Implikationen für die Reproduktionsmedizin. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 2006; 3: 136–140

Hackett JA, Surani MA. DNA methylation dynamics during the mammalian life cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368: 20110328

Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA. Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 2002; 117: 15–23

Hashimshony T, Zhang J, Keshet I, Bustin M, Cedar H. The role of DNA methylation in setting up chromatin structure during development. *Nat Genet* 2003; 34: 187–192

Helander KG. Kinetic studies of formaldehyde binding in tissue. *Biotech Histochem* 1994; 69: 177–179

Hendrickson A. Development of Retinal Layers in Prenatal Human Retina. *Am J Ophthalmol* 2016; 161: 29-35.e1

Hennig AK, Peng G-H, Chen S. Transcription coactivators p300 and CBP are necessary for photoreceptor-specific chromatin organization and gene expression. *PloS one* 2013; 8: e69721

Herberth G, Bauer M, Gasch M, ..., Lehmann I. Maternal and cord blood miR-223 expression associates with prenatal tobacco smoke exposure and low regulatory T-cell numbers. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 543–550

Herwig-Carl MC, Loeffler KU, Müller AM. Bedeutung der Untersuchung fetaler Augen : Ergänzung der Fetobduktion. *Pathologe* 2017; 38: 231–240

Herwig-Carl MC, Sharma A, Höller T, Holz FG, Schlitter AM, Loeffler KU. Spatial intratumor heterogeneity in uveal melanoma: Tumor cell subtypes with a presumed invasive potential exhibit a particular epigenetic staining reaction. *Exp Eye Res* 2019; 182: 175–181

Hinrichsen KV, Beier HM, Breucker H, ..., Wartenberg H. *Humanembryologie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2014

Hon GC, Rajagopal N, Shen Y, McCleary DF, Yue F, Dang MD, Ren B. Epigenetic memory at embryonic enhancers identified in DNA methylation maps from adult mouse tissues. *Nat Genet* 2013; 45: 1198–1206

Horn F. *Biochemie des Menschen*. Stuttgart - New York: Thieme, 2015

Horsthemke B, Buiting K. Genomic imprinting and imprinting defects in humans. *Adv Genet* 2008; 61: 225–246

Hoshino A, Ratnapriya R, Brooks MJ, ..., Reh TA. Molecular Anatomy of the Developing Human Retina. *Dev Cell* 2017; 43: 763-779.e4

Hughes AEO, Enright JM, Myers CA, Shen SQ, Corbo JC. Cell Type-Specific Epigenomic Analysis Reveals a Uniquely Closed Chromatin Architecture in Mouse Rod Photoreceptors. *Sci Rep* 2017; 7: 43184

Iqbal K, Jin S-G, Pfeifer GP, Szabó PE. Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3642–3647

Isensee J, Ruiz Noppinger P. Sexually dimorphic gene expression in mammalian somatic tissue. *Gend Med* 2007; 4 Suppl B: S75-95

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl: 245–254

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 253–262

Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999; 15: 34–37

Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 484–492

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19: 187–191

Kalil RE. The influence of action potentials on the development of the central visual pathway in mammals. *J Exp Biol* 1990; 153: 261–276

Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet* 2012; 81: 303–311

Keppler BR, Archer TK. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1. *Expert Opin Ther Targets* 2008; 12: 1301–1312

Kerkel K, Schupf N, Hatta K, ..., Tycko B. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet* 2010; 6: e1001212

Kim J-W, Jang S-M, Kim C-H, An J-H, Choi K-H. Transcriptional activity of neural retina leucine zipper (Nrl) is regulated by c-Jun N-terminal kinase and Tip60 during retina development. *Mol Cell Biol* 2012; 32: 1720–1732

Koh KP, Yabuuchi A, Rao S, ..., Rao A. Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell stem cell* 2011; 8: 200–213

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693–705

Lang G. *Histotechnik*. Wien - New York: Springer, 2013

Ley D, Marsal K, Dahlgren J, Hellstrom A. Abnormal retinal optic nerve morphology in young adults after intrauterine growth restriction. *Pediatr Res* 2004; 56: 139–143

Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 6: a019133

Li M, Jia C, Kazmierkiewicz KL, ..., Stambolian D. Comprehensive analysis of gene expression in human retina and supporting tissues. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 4001–4014

Linden R, Rehen SK, Chiarini LB. Apoptosis in developing retinal tissue. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18: 133–165

Lipton SA, Frosch MP, Phillips MD, Tauck DL, Aizenman E. Nicotinic antagonists enhance process outgrowth by rat retinal ganglion cells in culture. *Science* 1988; 239: 1293–1296

Lister R, Mukamel EA, Nery JR, ..., Ecker JR. Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* 2013; 341: 1237905

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2006

Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251–260

Lüllmann-Rauch R, Asan E. Taschenbuch Histologie. Stuttgart - New York: Thieme, 2015

MacArthur IC, Dawlaty MM. TET Enzymes and 5-Hydroxymethylcytosine in Neural Progenitor Cell Biology and Neurodevelopment. *Front Cell Dev Biol* 2021; 9: 645335

Mann I. The Development of the Human Eye. New York: Grune & Stratton, 1950

McDonnell F, Irnaten M, Clark AF, O'Brien CJ, Wallace DM. Hypoxia-Induced Changes in DNA Methylation Alter RASAL1 and TGFβ1 Expression in Human Trabecular Meshwork Cells. *PloS one* 2016; 11: e0153354

McNicol AM, Richmond JA. Optimizing immunohistochemistry: antigen retrieval and signal amplification. *Histopathology* 1998; 32: 97–103

Mellor J, Dudek P, Clynes D. A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation. *Curr Opin Genet Dev* 2008; 18: 116–122

Mellough CB, Bauer R, Collin J, ..., Lako M. An integrated transcriptional analysis of the developing human retina. *Development* 2019; 146

Merbs SL, Khan MA, Hackler L, Oliver VF, Wan J, Qian J, Zack DJ. Cell-specific DNA methylation patterns of retina-specific genes. *PloS one* 2012; 7: e32602

Messerschmidt DM, Knowles BB, Solter D. DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* 2014; 28: 812–828

Mo A, Luo C, Davis FP, ..., Nathans J. Epigenomic landscapes of retinal rods and cones. *eLife* 2016; 5: e11613

Mo A, Mukamel EA, Davis FP, ..., Nathans J. Epigenomic Signatures of Neuronal Diversity in the Mammalian Brain. *Neuron* 2015; 86: 1369–1384

Mosashvilli D, Kahl P, Mertens C, Holzapfel S, Rogenhofer S, Hauser S, Büttner R, Ruecker A von, Müller SC, Ellinger J. Global histone acetylation levels: prognostic relevance in patients with renal cell carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101: 2664–2669

Murphy DP, Hughes AE, Lawrence KA, Myers CA, Corbo JC. Cis-regulatory basis of sister cell type divergence in the vertebrate retina. *eLife* 2019; 8

Murphy SK, Jirtle RL. Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays* 2003; 25: 577–588

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998; 393: 386–389

Nestor CE, Ottaviano R, Reddington J, Sproul D, Reinhardt D, Dunican D, Katz E, Dixon JM, Harrison DJ, Meehan RR. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res* 2012; 22: 467–477

Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29: 144–168

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247–257

O'Rahilly R. The timing and sequence of events in the development of the human eye and ear during the embryonic period proper. *Anat Embryol* 1983; 168: 87–99

Painter RC, Osmond C, Gluckman P, Hanson M, Phillips DIW, Roseboom TJ. Transgenerational effects of prenatal exposure to the Dutch famine on neonatal adiposity and health in later life. *BJOG* 2008; 115: 1243–1249

Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv* 2016; 2: e1600584

Pang APS, Sugai C, Maunakea AK. High-throughput sequencing offers new insights into 5-hydroxymethylcytosine. *Biomol Concepts* 2016; 7: 169–178

Pomerleau J, Weidmann C, Coutant K, Lowry C-M, Veilleux M-P, Bérubé J, Wagner JR, Landreville S. Experimental eye research / short communication format characterization of DNA hydroxymethylation in the ocular choroid. *Exp Eye Res* 2021; 205: 108473

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1057–1068

Probst AV, Dunleavy E, Almouzni G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 192–206

Quinn PMJ, Wijnholds J. Retinogenesis of the Human Fetal Retina: An Apical Polarity Perspective. *Genes* 2019; 10

Qureshi IA, Mehler MF. Advances in epigenetics and epigenomics for neurodegenerative diseases. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011; 11: 464–473

Radtke KM, Ruf M, Gunter HM, Dohrmann K, Schauer M, Meyer A, Elbert T. Transgenerational impact of intimate partner violence on methylation in the promoter of the glucocorticoid receptor. *Transl Psychiatry* 2011; 1: e21

Raeisossadati R, Ferrari MFR, Kihara AH, Aldiri I, Gross JM. Epigenetic regulation of retinal development. *Epigenetics Chromatin* 2021; 14: 11

Rai K, Chidester S, Zavala CV, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Jones DA, Cairns BR. Dnmt2 functions in the cytoplasm to promote liver, brain, and retina development in zebrafish. *Genes Dev* 2007; 21: 261–266

Rai K, Jafri IF, Chidester S, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA. Dnmt3 and G9a cooperate for tissue-specific development in zebrafish. *J Biol Chem* 2010; 285: 4110–4121

Rai K, Nadauld LD, Chidester S, Manos EJ, James SR, Karpf AR, Cairns BR, Jones DA. Zebra fish Dnmt1 and Suv39h1 regulate organ-specific terminal differentiation during development. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7077–7085

Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 2005; 42: 405–426

Ramsay M. Genetic and epigenetic insights into fetal alcohol spectrum disorders. *Genome Med* 2010; 2: 27

Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 2007; 447: 425–432

Rhee K-D, Yu J, Zhao CY, Fan G, Yang X-J. Dnmt1-dependent DNA methylation is essential for photoreceptor terminal differentiation and retinal neuron survival. *Cell Death Dis* 2012; 3: e427

Rhodes RH. A light microscopic study of the developing human neural retina. *Am J Anat* 1979; 154: 195–209

Rinn JL, Snyder M. Sexual dimorphism in mammalian gene expression. *Trends Genet* 2005; 21: 298–305

Rodieck RW. Starburst amacrine cells of the primate retina. *J Comp Neurol* 1989; 285: 18–37

Rosa JM, Bos R, Sack GS, Fortuny C, Agarwal A, Bergles DE, Flannery JG, Feller MB. Neuron-glia signaling in developing retina mediated by neurotransmitter spillover. *eLife* 2015; 4

Rotem A, Ram O, Shores N, Sperling RA, Goren A, Weitz DA, Bernstein BE. Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol* 2015; 33: 1165–1172

Ruzov A, Tsenkina Y, Serio A, ..., de Sousa P. Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 2011; 21: 1332–1342

Sachsenweger M, Volker K, Nasemann J, Ugi I. *Duale Reihe Augenheilkunde*. Stuttgart - New York: Thieme, 2002

Sadler TW, Langman J. *Taschenlehrbuch Embryologie*. Stuttgart - New York: Thieme, 2014

Sasaki H, Matsui Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 129–140

Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik*. Berlin - Heidelberg: Springer, 2018

Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368: 20110330

Seritrakul P, Gross JM. Tet-mediated DNA hydroxymethylation regulates retinal neurogenesis by modulating cell-extrinsic signaling pathways. *PLoS Genet* 2017; 13: e1006987

Sharma A, Jamil MA, Nuesgen N, ..., El-Maarri O. DNA methylation signature in peripheral blood reveals distinct characteristics of human X chromosome numerical aberrations. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 76

Shen LL, Mangalesh S, McGeehan B, Tai V, Sarin N, El-Dairi MA, Freedman SF, Maguire MG, Toth CA. Birth Weight Is a Significant Predictor of Retinal Nerve Fiber Layer Thickness at 36 Weeks Postmenstrual Age in Preterm Infants. *Am J Ophthalmol* 2021; 222: 41–53

Shi Y, Zhang H, Huang S, Yin L, Wang F, Luo P, Huang H. Epigenetic regulation in cardiovascular disease: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 2022; 7: 200

Shock LS, Thakkar PV, Peterson EJ, Moran RG, Taylor SM. DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3630–3635

Singh RK, Diaz PE, Binette F, Nasonkin IO. Immunohistochemical Detection of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine in Developing and Postmitotic Mouse Retina. *J Vis Exp* 2018; 138: e58274

Singh RK, Mallela RK, Hayes A, Dunham NR, Hedden ME, Enke RA, Fariss RN, Sternberg H, West MD, Nasonkin IO. Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b cooperate in photoreceptor and outer plexiform layer development in the mammalian retina. *Exp Eye Res* 2017; 159: 132–146

Slieker RC, Roost MS, van Iperen L, Suchiman HED, Tobi EW, Carlotti F, de Koning EJP, Slagboom PE, Heijmans BT, Chuva de Sousa Lopes SM. DNA Methylation Landscapes of Human Fetal Development. *PLoS Genet* 2015; 11: e1005583

Smallwood SA, Lee HJ, Angermueller C, Krueger F, Saadeh H, Peat J, Andrews SR, Stegle O, Reik W, Kelsey G. Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* 2014; 11: 817–820

Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, Meissner A. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 2012; 484: 339–344

Solovei I, Kreysing M, Lanctôt C, Kösem S, Peichl L, Cremer T, Guck J, Joffe B. Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 2009; 137: 356–368

Spiers H, Hannon E, Schalkwyk LC, Smith R, Wong CCY, O'Donovan MC, Bray NJ, Mill J. Methylomic trajectories across human fetal brain development. *Genome Res* 2015; 25: 338–352

Spira AW, Hollenberg MJ. Human retinal development: ultrastructure of the inner retinal layers. *Dev Biol* 1973; 31: 1–21

Suter MA, Aagaard-Tillery KM. Environmental influences on epigenetic profiles. *Semin Reprod Med* 2009; 27: 380–390

Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, ..., Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 2009; 324: 930–935

Tamm ER, Ohlmann A. Entwicklung des menschlichen Auges. *Ophthalmologe* 2012; 109: 911–928

Telegina DV, Kozhevnikova OS, Antonenko AK, Kolosova NG. Features of Retinal Neurogenesis as a Key Factor of Age-Related Neurodegeneration: Myth or Reality? *Int J Mol Sci* 2021; 22

Tobi EW, Lumey LH, Talens RP, Kremer D, Putter H, Stein AD, Slagboom PE, Heijmans BT. DNA methylation differences after exposure to prenatal famine are common and timing- and sex-specific. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 4046–4053

Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, Kellner S, Frye M, Helm M, Stoecklin G, Lyko F. RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nat Struct Mol Biol* 2012; 19: 900–905

Ueno K, Iwagawa T, Kuribayashi H, Baba Y, Nakauchi H, Murakami A, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Transition of differential histone H3 methylation in photoreceptors and other retinal cells during retinal differentiation. *Sci Rep* 2016; 6: 29264

Ueno K, Iwagawa T, Ochiai G, Koso H, Nakauchi H, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. Analysis of Müller glia specific genes and their histone modification using Hes1-promoter driven EGFP expressing mouse. *Sci Rep* 2017; 7: 3578

Valinluck V, Sowers LC. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res* 2007; 67: 946–950

VandenBosch LS, Wohl SG, Wilken MS, Hooper M, Finkbeiner C, Cox K, Chipman L, Reh TA. Developmental changes in the accessible chromatin, transcriptome and Ascl1-binding correlate with the loss in Müller Glial regenerative potential. *Sci Rep* 2020; 10: 13615

Verdijk RM, Herwig-Carl MC. *Fetal and Neonatal Eye Pathology*. Cham: Springer, 2020

Waddington CH. The epigenotype. *Endeavour* 1942; 1: 18–20

Wagner M, Steinbacher J, Kraus TFJ, ..., Carell T. Age-dependent levels of 5-methyl-, 5-hydroxymethyl-, and 5-formylcytosine in human and mouse brain tissues. *Angew Chem Int Ed Engl* 2015; 54: 12511–12514

Watson CJ, Collier P, Tea I, ..., Baugh JA. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Hum Mol Genet* 2014; 23: 2176–2188

Watson JA, Watson CJ, McCrohan A-M, ..., McCann A. Generation of an epigenetic signature by chronic hypoxia in prostate cells. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 3594–3604

Weber AR, Krawczyk C, Robertson AB, Kuśnierczyk A, Vågbo CB, Schuermann D, Klungland A, Schär P. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism. *Nat Commun* 2016; 7: 10806

Wijchers PJ, Festenstein RJ. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends Genet* 2011; 27: 132–140

Wong RO. Cholinergic regulation of Ca²⁺ during cell division and differentiation in the mammalian retina. *J Neurosci* 1995; 15: 2696–2706

Wong RO, Oakley DM. Changing patterns of spontaneous bursting activity of on and off retinal ganglion cells during development. *Neuron* 1996; 16: 1087–1095

Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2011; 2: 241

Wu H, Zhang Y. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* 2014; 156: 45–68

Zhang R-W, Du W-J, Prober DA, Du J-L. Müller Glial Cells Participate in Retinal Waves via Glutamate Transporters and AMPA Receptors. *Cell Rep* 2019; 27: 2871-2880.e2

Zhang X, Zhao L, Hambly B, Bao S, Wang K. Diabetic retinopathy: reversibility of epigenetic modifications and new therapeutic targets. *Cell Biosci* 2017; 7: 42

Zhou ZJ. Direct participation of starburst amacrine cells in spontaneous rhythmic activities in the developing mammalian retina. *J Neurosci* 1998; 18: 4155–4165

Zibetti C. Deciphering the Retinal Epigenome during Development, Disease and Reprogramming: Advancements, Challenges and Perspectives. *Cells* 2022; 11

Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 2003; 130: 5155–5167

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitäts-Augenklinik Bonn unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. med. Martina Herwig-Carl durchgeführt. Die Konzeption der Studie sowie die Auswahl der untersuchten Kohorte erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. med. Martina Herwig-Carl.

Das zur Auswertung verwendete Gewebematerial wurde vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt. Die Vorbereitung der Proben vor der Paraffineinbettung sowie die makroskopische und mikroskopische Begutachtung auf strukturelle Anomalien wurden von den Mitarbeitenden des ophthalmopathologischen Labors durchgeführt. Die Anfertigung der Schnitte der für die Kohorte verwendeten Präparate wurde eigenständig von mir vorgenommen.

Die immunhistochemischen Färbungen wurden nach einer Einarbeitung durch Frau Parand Widmar eigenständig von mir durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung der Färbereaktionen erfolgte unabhängig durch Frau Prof. Dr. med. Martina Herwig-Carl und mich; zur Analyse wurde der Mittelwert beider Bewertungen herangezogen.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch mich nach methodischer Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie des Universitätsklinikums Bonn.

Die Erstellung der Bilder der Kohorte wurde von mir durchgeführt.

Bei der Erstellung der Arbeit verwendete ich ChatGPT zur stilistischen Überarbeitung einzelner Passagen, um die Verständlichkeit und den Lesefluss zu verbessern. Nach der Verwendung dieses Tools habe ich die entsprechenden Textstellen überprüft und übernehme die volle Verantwortung für den Inhalt der veröffentlichten Dissertationsschrift.

Die Abbildungen 1 und 9 wurden von mir mithilfe der Software Microsoft PowerPoint erstellt. Die Abbildung 8 habe ich mit der Software ChemSketch von ACD/Labs erstellt.

Die Abbildungen 10, 12, 14, 16, 18 sowie 19 wurden mithilfe der Software Microsoft Excel angefertigt. Die Abbildung 20 habe ich mit der Software IBM SPSS Statistics 27 erstellt.

Die Darstellungen der Präparate in Abbildung 2 und 4 habe ich selbst erstellt, verwendet wurden dazu Präparate aus dem Archiv des ophthalmopathologischen Labors.

Im Rahmen der Arbeiten zu dieser Dissertation entstand ein Manuskript mit dem Titel „Global epigenetic immunohistochemical markers reveal developmental connections of distinct cell types during fetal development“. Das Manuskript wurde bei „Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology“ eingereicht und es wurde am 11.11.2025 zur Veröffentlichung angenommen.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Veröffentlichung

Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift sind Bestandteil der folgenden Publikation, die zur Veröffentlichung angenommen wurde:

Jost MT, Loeffler KU, Holz FG, Sharma A, Schmitz MT, Müller AM, Herwig-Carl MC. Global epigenetic immunohistochemical markers reveal developmental connections of distinct cell types during fetal development. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol [angenommen zur Veröffentlichung am 11.11.2025]

11. Danksagung

Meine Dissertation wäre ohne die Unterstützung und Hilfe vieler Menschen nicht möglich gewesen. Ich möchte daher an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, meinen aufrichtigen Dank auszusprechen.

Ein ganz besonderer Dank gebührt allen voran meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Martina Herwig-Carl, welche mich während meiner Promotionszeit stets aufmerksam begleitet hat. Ihre Expertise, kontinuierliche Unterstützung und ermutigenden Rückmeldungen haben wesentlich zum Gelingen meiner Promotion beigetragen und mir immer wieder neue Perspektiven eröffnet.

Ein herzlicher Dank geht an Frau Parand Widmar für die umfassende Unterstützung bei sämtlichen Labortätigkeiten, die zur Erstellung der immunhistochemischen Präparate unerlässlich waren.

Zudem möchte ich Frau Prof. Dr. med. Karin Löffler für die anregenden Fachgespräche und das großzügige Teilen ihres umfassenden ophthalmopathologischen Wissens danken.

Ein weiterer Dank gebührt Frau Dr. Marie-Therese Schmitz für ihre wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten.

Schließlich möchte ich meiner Familie und meiner Freundin meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihr Rückhalt und ihre liebevolle Begleitung haben mich auf jedem Schritt meines Weges gestärkt. Ohne sie wäre dieses Projekt nicht dasselbe gewesen. Ihre ständige Ermutigung und Unterstützung haben mich dazu befähigt, mein Bestes zu geben.