

ARTIKEL OFFEN



Wirksamer Schutz der Photorezeptoren durch ein entzündungsempfindliches Hydrogel zur Abschwächung der Degeneration der äußeren Netzhaut

Hyerim Kim^{1,10}, Hyeonhee Roh^{2,3,10}, Sang-Heon Kim^{4,5}, Kangwon Lee^{6,7} ✉, Maesoon Im^{2,5,8} ✉ und Seung Ja Oh⁹ ✉

Retinitis pigmentosa (RP) ist eine degenerative Erkrankung der äußeren Netzhaut, die zum Absterben der Photorezeptorzellen und zu einem tiefgreifenden Sehverlust führen kann. Obwohl eine wirksame Regulierung der intraretinalen Entzündung das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen kann, fehlt es noch an einer wirksamen entzündungshemmenden Behandlungsstrategie. In dieser Studie wird über die Herstellung eines auf Hyaluronsäure basierenden entzündungsempfindlichen Hydrogels (IRH) und dessen epigenetische Regulierungseffekte auf die Netzhautdegeneration berichtet. Das injizierbare IRH wurde so konzipiert, dass es auf die Überexpression von Cathepsin in einer entzündlichen Umgebung reagiert. Der epigenetische Wirkstoff, die Inhibitoren des Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), wurde in das Hydrogel eingebracht, um Entzündungsfaktoren abzuschwächen. Die entzündungshemmende Wirkung des mit dem Medikament beladenen IRH auf Mikrogliazellen wurde *in vitro* und *in vivo* im Modell der Netzhautdegeneration 10 (*rd10*) bei Mäusen nachgewiesen. Unser IRH hat also nicht nur die intraretinale Entzündung reduziert, sondern auch die Photorezeptoren morphologisch und funktionell geschützt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass das hier vorgestellte IRH verwendet werden kann, um den durch RP verursachten Sehverlust erheblich zu verzögern.

npj Regenerative Medizin

(2023) 8:68

; <https://doi.org/10.1038/s41536-023-00342-y>

EINFÜHRUNG

Retinitis pigmentosa (RP) ist eine degenerative Erkrankung der äußeren Netzhaut, bei der die Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren nach und nach geschädigt werden, was zu einem tiefgreifenden Sehverlust führt. Es ist bekannt, dass das allmähliche Absterben der Stäbchenzellen im Frühstadium dieser Krankheit auf Mutationen in einem von mehr als 90 verschiedenen Genen zurückzuführen ist¹. Nach der Degeneration der Stäbchen folgt der Tod der Zapfenzellen, gefolgt von Veränderungen der Mikroumgebung, einschließlich oxidativem Stress und Entzündungen in der Netzhaut². Es ist bekannt, dass insbesondere Entzündungen mit der Netzhautdegeneration selbst in Verbindung stehen³: Aktivierte entzündliche Mikroglia *verschlängen* nicht-apoptotische Stäbchen und sezernieren entzündliche Moleküle, die schließlich sowohl die Stäbchenapoptosis als auch die Zapfendegeneration beschleunigen^{4–6}. Daher können entzündungshemmende Behandlungen der entzündlichen Mikroglia das Fortschreiten der Netzhautdegeneration erheblich verzögern und die Photorezeptoren möglicherweise vor dem Zelltod bewahren. Jüngste Studien haben gezeigt, dass eine epigenetische Regulierung der degenerativen retinalen Mikroumgebung das Überleben der Zapfenzellen verbessert⁴ und unterdrückt Entzündungen in einem RP-Tiermodell⁷. Insbesondere wurde berichtet, dass das Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) in der degenerierten Netzhaut eines Mausmodells überexprimiert wird, was zum Tod der Stäbchenzellen beiträgt⁸. Außerdem konnte durch die Hemmung von EZH2 die Zahl der entzündlichen Mikroglia bei einer neuroinflammatorischen Erkrankung wirksam gesenkt werden⁹. Daher könnte die Unterdrückung von EZH2 möglicherweise eine ähnliche entzündungshemmende Wirkung bei degenerativen Netzhauterkrankungen wie RP haben; sie wurde jedoch noch nicht als therapeutischer Ansatz für eine degenerative Netzhauterkrankung untersucht.

Entzündungshemmende Medikamente können intravitreal verabreicht werden in

den intraokularen Raum. Die intraokulare Injektion von Arzneimitteln weist jedoch einige Einschränkungen auf, wie z. B. Veröffentlicht in Zusammenarbeit mit dem Australischen Institut für Regenerative Medizin

die schnelle Ausscheidung des Arzneimittels über die anteriore oder posteriore Clearance, die unspezifische Verteilung und die Notwendigkeit wiederholter Injektionen¹⁰. Diese Probleme können durch die Verwendung von

Die Entwicklung eines geeigneten Arzneimittelträgers für die intraokulare Verabreichung ist jedoch eine Herausforderung, da das Auge ein hochkomplexes und spezialisiertes Organ des Körpers ist. Als Hauptbestandteil des Glaskörpers wurde Hyaluronsäure (HA) aufgrund ihrer hohen Biokompatibilität, ihrer biologischen Abbaubarkeit, ihrer Viskoelastizität und ihrer Injektionsfähigkeit eingehend als Arzneimittelträger für Augenkrankheiten (z. B. Glaukom und trockenes Auge) untersucht¹¹. Trotz dieser Vorteile hat HA immer noch einige Einschränkungen: eine kurze Verweildauer im intraokularen Gewebe und eine unkontrollierte Abgabe von Medikamenten. Um diese Einschränkungen zu überwinden, wurden vernetzte HA entwickelt, die eine verbesserte Verweildauer, eine anhaltende Wirkstofffreisetzung und eine höhere Stabilität aufweisen¹². Es gab jedoch Bedenken hinsichtlich der Toxizität von chemischen Vernetzungsmitteln (z. B. Divinylsulfon, Glutaraldehyd und Carbodiimid), die zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von HA¹³. Daher kann die auf kupferfreier Click-Chemie basierende Vernetzungsmethode

eine Alternative für HA-Hydrogel sein, da sie Vorteile wie eine schnelle Gelierzeit, hohe mechanische Eigenschaften und Biokompatibilität bietet.^{14,15} Zur Verbesserung der therapeutischen Wirkung und zur Abschwächung der Nebenwirkungen von Arzneimitteln wurden Hydrogele entwickelt, die auf verschiedene Stimuli hin Arzneimittel freisetzen und zur Behandlung von Augenkrankheiten eingesetzt werden. So haben beispielsweise mehrere Hydrogele gezeigt, dass sie thermosensitiv¹⁶, Matrix-Metalloproteinase-empfindlich¹⁷ und lichtempfindlich¹⁸ Eigenschaften gezeigt. Obwohl die auf Reize reagierende Eigenschaft für die genaue Medikamentenabgabe nach Bedarf attraktiv ist, wurden diese Hydrogele nicht auf ihre therapeutische Wirkung bei Netzhautdegenerationen geprüft. Außerdem wurde die entzündungsempfindliche Funktion noch nicht implementiert.

In der vorliegenden Studie berichten wir über ein auf Entzündungen reagierendes, mit einer Spritze injizierbares HA-Hydrogel, das in der Lage ist, entzündungshemmende Medikamente (z. B. EZH2-Inhibitor) nach Bedarf freizusetzen. Wir haben das HA-basierte Hydrogel so konzipiert, dass es eine wirksame intraretinale

¹Programm für Nanowissenschaft und -technologie, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul 08826, Südkorea. ²Institut für Gehirnforschung, Korea Institute of Science and Technology (KIST), Seoul 02792, Südkorea. ³School of Electrical Engineering, College of Engineering, Korea University, Seoul 02841, Südkorea. ⁴Zentrum für Biomaterialien, Biomedizinisches Forschungsinstitut, KIST, Seoul 02792, Südkorea. ⁵Abteilung für biomedizinische Wissenschaft und Technologie, KIST School, University of Science and Technology (UST), Seoul 02792, Südkorea. ⁶Abteilung für angewandte Biotechnik, Graduate School of Convergence Science and Technology, Seoul National University, Seoul 08826, Südkorea. ⁷Forschungsinstitut für Konvergenzwissenschaft, Seoul National University, Seoul 08826, Südkorea. ⁸KHU-KIST Abteilung für Konvergenzwissenschaft und -technologie, Kyung Hee Universität, Seoul 02447, Südkorea. ⁹Abteilung für Genetik und Biotechnologie, Hochschule für Lebenswissenschaften, Kyung Hee Universität, Yongin 17104, Südkorea. ¹⁰Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen: Hyerim Kim, Hyeonhee Roh. [✉]E-Mail: kangwonlee@snu.ac.kr; maesoon.im@kist.re.kr; seungja.oh@khu.ac.kr

EZH2-Inhibitor als Reaktion auf intraokulare Entzündungen freizusetzen und dadurch eine entzündungshemmende Wirkung durch epigenetische Regulierung der entzündlichen Mikroglia während der fortschreitenden Netzhautdegeneration zu erzielen, was schließlich zu einem verzögerten Sehverlust führt. Um die Funktion des auf Entzündungen reagierenden Hydrogels (IRH) zu beurteilen, haben wir die Freisetzungskinetik des Medikaments als Reaktion auf Kathepsine untersucht, die bekanntermaßen in entzündlichen Umgebungen überexprimiert werden. Anschließend haben wir die entzündungshemmende Wirkung des mit EZH2-Inhibitoren beladenen Hydrogels in vitro mit der entzündlichen SV40-Mikroglia-Zelllinie untersucht. Wir haben auch die Leistung der Verzögerung der Netzhautdegeneration des IRH in vivo durch Immunfluoreszenzfärbung von Mikroglia und Entzündungsmarkern in den Netzhäuten von Mäusen mit Netzhautdegeneration (*rd10*), einem RP-Mausmodell, bestätigt. Schließlich wurde der gemilderte Verlust der Sehfunktion durch elektrophysiologische Aufzeichnungen von retinalen Ganglienzellen, den Ausgangsneuronen der Netzhaut, nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass mehr Photorezeptoren vor der Degeneration bewahrt wurden als in der Kontrollgruppe.

ERGEBNISSE

Überexprimierung von Cathepsin bei Entzündungsaktivitäten der Netzhautdegeneration

Um einen Ziel-Biomarker für ein auf Entzündungen reagierendes Hydrogel (IRH) zu identifizieren, haben wir zunächst Biomoleküle untersucht, die bei fortschreitender Netzhautdegeneration (RD) durch Entzündungen vermehrt auftreten. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Kathepsin-Enzyme in einer entzündlichen Umgebung wie Hautwunden, rheumatischen Gelenken und entzündlichen Hirnerkrankungen überexprimiert werden¹⁹. Hohe Mengen an Kathepsin werden von Immunzellen in entzündlichen Umgebungen wie entzündlichen M1-Makrophagen ausgeschieden.^{20,21} Kathepsine sind Cysteinproteasen, die bei physiologischen Prozessen verschiedener entzündlicher Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielen²². Darüber hinaus bauen die sezernierten Cathepsine die extrazelluläre Matrix ab, und die proteolytische Fähigkeit der Cathepsine ermöglicht die Entwicklung eines Cathepsin-empfindlichen Hydrogels durch die Erzeugung eines von den Cathepsinen abgebauten Proteinnetzwerks. Da verschiedene Cathepsin-Subtypen gleichzeitig in der entzündlichen Mikroumgebung ausgeschieden werden²³ haben wir ein auf Kathepsine reagierendes Hydrogel entwickelt, das auf verschiedene Kathepsin-Enzyme anspricht. Um zu testen, ob das Kathepsin als Biomarker für IRH bei RD dienen kann, analysierten wir die Konzentrationen verschiedener Entzündungsmarker und Kathepsin-Subtypen in den Netzhäuten von *rd10*-Mäusen, einem gut etablierten RP-Modell. Zunächst haben wir die mRNA-Expressionswerte von sechs repräsentativen Entzündungsmarkern gemessen: Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , Interleukin 1 β (IL1 β), C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 5 (CCL5), T-Lymphozyten-Aktivierungsantigen CD86 und Cluster of Differentiation 68 (CD68). Die Tiere wurden in der 3. bzw. 7. postnatalen Woche (PW) geopfert, was dem frühen bzw. mittleren Stadium der RD entspricht.^{24–26} Als Kontrollgruppen wurden altersgleiche Wildtyp-Mäuse (*wt*) verwendet. In der 3. Lebenswoche schienen die ersten drei Marker (d. h. TNF- α , IL1 β und CCL2) nicht anzusteigen, während die anderen drei Marker (d. h. CCL5, CD86 und CD68) selbst in diesem frühen RD-Stadium signifikant erhöhte mRNA-Werte aufwiesen (vgl. die beiden Balken ganz links in den Unterbildern in Abb. 1a). Die Expressionswerte aller von uns getesteten Entzündungsfaktoren waren bei den *rd10*-Mäusen mit dem Fortschreiten der Krankheit bis zum Alter von PW7 erhöht

(vgl. die beiden rechten Balken der Untertafeln in Abb. 1a). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass RP mit Entzündungsaktivitäten einhergeht.

Im Verhältnis zur Entzündungsreaktion waren die mRNA- und Proteinaktivität der drei Subtypen (d. h. L, S und B) der Cathepsin-Enzyme in den *rd10*-Mäusen aus PW3 ebenfalls hochreguliert (Abb. 1b, c). Zusätzlich zu den mRNA-Analysen und den Proteinaktivitätstests führten wir Immunfluoreszenzfärbungen der oben genannten Biomoleküle durch. Insbesondere CD68 als phagozytische Funktion der entzündlichen Mikroglia (Iba1 + CD68+) in

der Netzhaut, von der bekannt ist, dass sie die Degeneration der Photorezeptoren beschleunigt⁴ wurde in der äußeren Kernschicht (ONL) und der inneren plexiformen Schicht (IPL) bei PW3 bzw. PW7 der rd10-Tiere nachgewiesen (obere Reihe in Abb. 1d). Auch der andere Entzündungsmarker TNF- α wurde in der Ganglienzellschicht (GCL) gefunden (untere Reihe von Abb. 1d), und es stimmte mit den Ergebnissen der mRNA-Spiegel überein, dass PW7-Tiere einen erhöhten Spiegel aufwiesen (vergleiche mit dem ganz linken Unterpanel von Abb. 1a). Interessanterweise wurden in den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung (Abb. 1e) Cathepsine in mehreren Netzhautschichten beobachtet: Zum Beispiel wurden alle Subtypen von Cathepsinen in den äußeren Segmenten der Photorezeptoren (d. h. direkt über der ONL) bei PW3-Tieren (linke Spalte von Abb. 1e) schwach nachgewiesen. Starke Banden von Cathepsin L und B wurden ebenfalls in diesem frühen Stadium der RD gefunden. Dann scheint sich die Expression aller drei Subtypen mit fortschreitender RD weit zu verbreiten (rechte Spalte in Abb. 1e). Insgesamt führte das durch die vererbte RD induzierte entzündliche Umfeld zu einer Überexpression von Cathepsin. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gezielte Steuerung von Cathepsinen die Entwicklung von Hydrogelen für die Entzündungsreaktion ermöglicht, die auch für die Behandlung von RP eingesetzt werden können.

Herstellung eines injizierbaren, auf Entzündungen reagierenden Hydrogels, das je nach Krankheitsaktivität nach Bedarf entzündungshemmende Medikamente freisetzen kann

Es hat sich gezeigt, dass die bedarfsgerechte Verabreichung von Arzneimitteln nicht nur die Nebenwirkungen einer Überdosierung verringern, sondern auch die therapeutische Wirkung verstärken kann, indem die Menge des verabreichten Medikaments je nach Schweregrad der Zielkrankheit optimiert wird^{17,23,27}. Wir haben IRHs durch Vernetzung von DBCO-konjugiertem HA mit einem durch Cathepsin spaltbaren Vernetzer hergestellt. Auch der EZH2-Inhibitor wurde eingekapselt, als das Hydrogel vernetzt wurde (Abb. 2a). Die Abbaugeschwindigkeit des IRH wurde so konzipiert, dass sie von der Menge an Cathepsin abhängt, die in der entzündlichen Mikroumgebung ausgeschieden wird. Das hergestellte Hydrogel, das das Arzneimittel enthielt, konnte intravitreal in den Augapfel injiziert werden (Abb. 2b). Das IRH wurde durch übermäßig ausgeschiedene Cathepsine in der entzündlichen Mikroumgebung der Netzhaut abgebaut und setzte einen vorgeladenen EZH2-Inhibitor frei. Daher konnte das Hydrogel die Entzündung durch die bedarfsgerechte Freisetzung eines EZH2-Inhibitors als Reaktion auf entzündliche Aktivitäten im Frühstadium der RP wirksam lindern.

Ein injizierbares IRH wurde durch kupferfreie Klick-Chemie zwischen DBCO von HA und Azid eines durch Cathepsin spaltbaren Vernetzers (c-c Vernetzer) hergestellt (Abb. 3a). Die erfolgreiche Konjugation von DBCO an HA wurde mit ¹H-NMR bestätigt (siehe experimenteller Abschnitt): mehrere Peaks, die auf DBCO hinweisen, wurden zwischen 7 und 8 ppm nachgewiesen (siehe vergrößerte Einfügung links in Abb. 3b), was mit früheren Studien übereinstimmt^{14,28}. Auch die mechanischen Eigenschaften wurden mit einem Rheometer analysiert, und mit zunehmendem c-c-Vernetzer nahmen sowohl der Speichermodul (G') als auch der Verlustmodul (G'') zu, waren aber bei einer Konzentration von 2 mM gesättigt (Abb. 3c). Da der Speichermodul (G') für die Elastizität und der Verlustmodul (G'') für die Viskosität eines Materials steht, bedeutet ein Anstieg beider Parameter, dass die Viskoelastizität des IRH zunimmt. Die Steifigkeit des IRH, die anhand des Elastizitätsmoduls gemessen wurde, schien mit der höheren Konzentration des c-c-Vernetzers zuzunehmen, und der Modul betrug im Durchschnitt ~18 kPa,

wenn 1 mM c-c-Vernetzer verwendet wurde (Abb. 3d). In Anbetracht des niedrigen Moduls des Glaskörpers (der in der Regel mehrere Pa beträgt, aber je nach Studie variiert) besteht die Möglichkeit, dass es zu nachteiligen Effekten aufgrund eines mechanischen Missverhältnisses zwischen dem Hydrogel und dem Glaskörper kommt, was in zukünftigen Studien untersucht werden muss. Die interne Netzwerkstruktur des Hydrogels wurde mit zunehmender c-c-Vernetzerkonzentration dichter, wie die rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahmen zeigen (Abb. 3e). Ein dichteres internes Netzwerk bedeutet eine langsamere biologische Abbaugeschwindigkeit, wodurch sich die Verweildauer des Hydrogels am Ort der Erkrankung verlängert. Da die wichtigste Eigenschaft von Materialien für die intraokulare Injektion die Transparenz ist, haben wir die Durchlässigkeit des hergestellten IRH gemessen; die Transparenz betrug 98-100 % für alle c-c-Vernetzerkonzentrationen

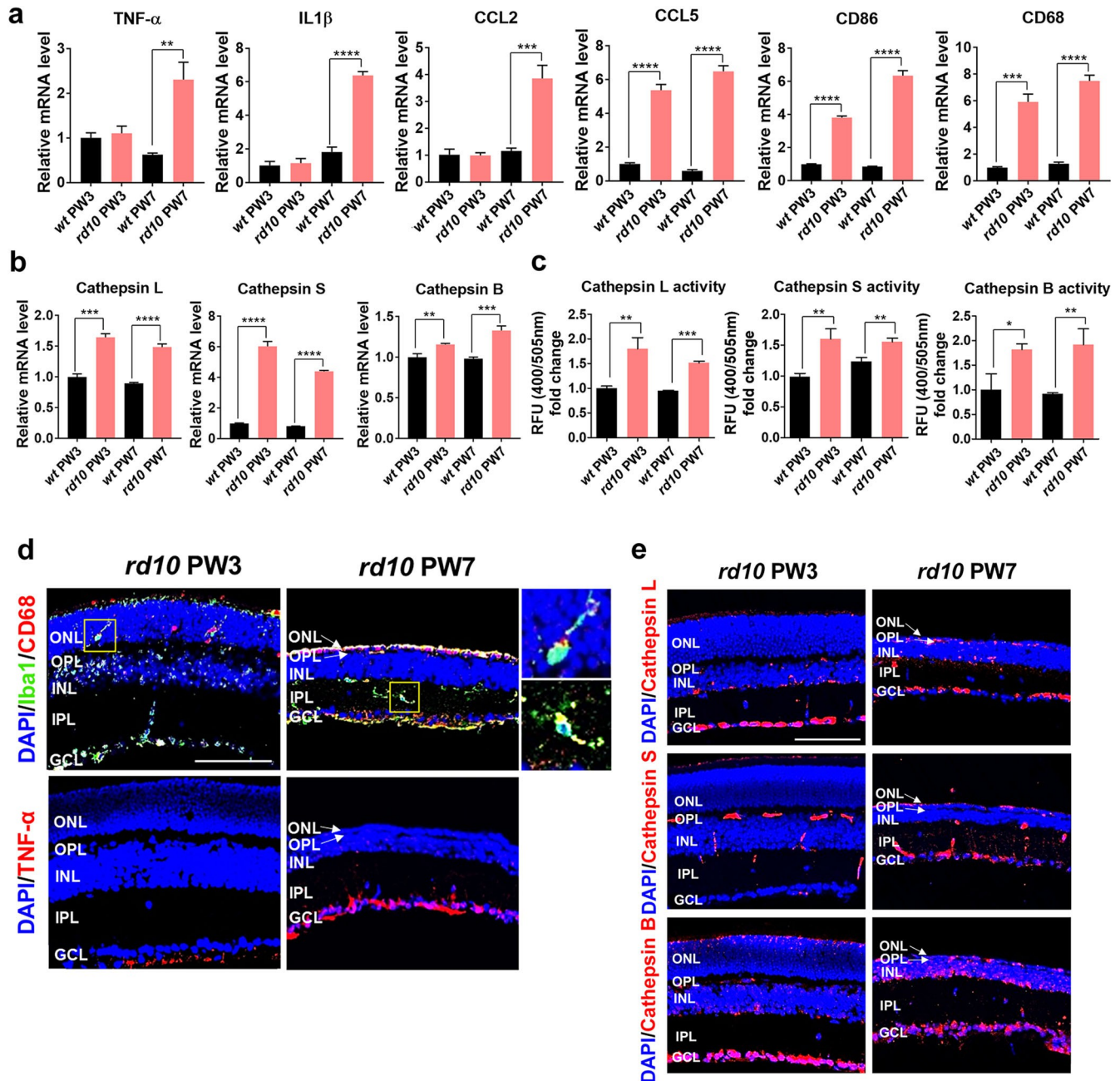


Abb. 1 Überexpression von Entzündungsfaktoren und Kathepsinen im Retinitis-Pigmentosa-in-vivo-Modell. **a** mRNA-Expressionsniveau von Entzündungsmarkern in der dritten (PW3) und siebten (PW7) postnatalen Woche nach der Geburt im Wildtyp- (*wt*) und Netzhautdegeneration- (*rd10*) Mausmodell (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **b** mRNA-Spiegel von Cathepsin L; S; und B zu verschiedenen Zeitpunkten im *wt*- und *rd10*-Mausmodell (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **c** Cathepsin-Aktivität im *wt*- und *rd10*-Mausmodell (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mit einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Test durchgeführt (* $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ und **** $p < 0,0001$). **d** Immunfluoreszenzfärbung von Iba1 (Mikroglia; grün); CD68 (Phagozytose; rot); und TNF- α (Entzündungsmarker; rot) im *rd10*-Mausmodell. Vergrößerte Ansichten der beiden gelb umrandeten Bereiche sind rechts zu sehen. Entzündliche Mikroglia (Iba1 + CD68+) in der gelben Box zeigten eine Migration von der ONL zur IPL, als die Netzhautdegeneration fortschritt und die ONL in PW7 *rd10*-Mäusen dünner wurde. **e** Immunfluoreszenzfärbung von Cathepsin L; S; und B zu verschiedenen Zeitpunkten im *rd10*-Mausmodell. ONL Äußere Kernschicht (Photorezeptorzellkörper), OPL Äußere plexiforme Schicht, INL Innere Kernschicht (Bipolarzellkörper), IPL Innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken zeigt 50 μ m und gilt für alle Bilder.

(d.h. 0,25, 0,5 und 1 mM), was darauf hindeutet, dass die verbleibende Sehkraft von RP-Patienten nicht beeinträchtigt wird, wenn das IRH in der zukünftigen klinischen Anwendung implantiert wird (Abb. 3f). Schließlich wurde die In-vitro-Zytotoxizität des IRH mit einem Zellviabilitätstest und dem Live & Dead/ Cytotoxicity Assay Kit (#L3224, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, U.S.A.) untersucht; unsere Ergebnisse zeigten eindeutig, dass das Hydrogel für die verschiedenen c-c-Vernetzerkonzentrationen nicht toxisch war (Abb. 3g, h). All diese

Ergebnisse deuten darauf hin, dass unsere IRHs über angemessene mechanische Eigenschaften verfügen,

optisch, und biokompatibel Eigenschaften für
intraokulare Implantation.

H. Kim et al.

npj

5

Bedarfsgerechte Medikamentenfreisetzung als Reaktion auf
entzündungsbedingte Enzyme

Um die Entzündungsreaktion des Hydrogels zu testen, wurde
Dextran

Fluoreszenzfarbstoff und in kleine Moleküle eingekapselte
Hydrogele

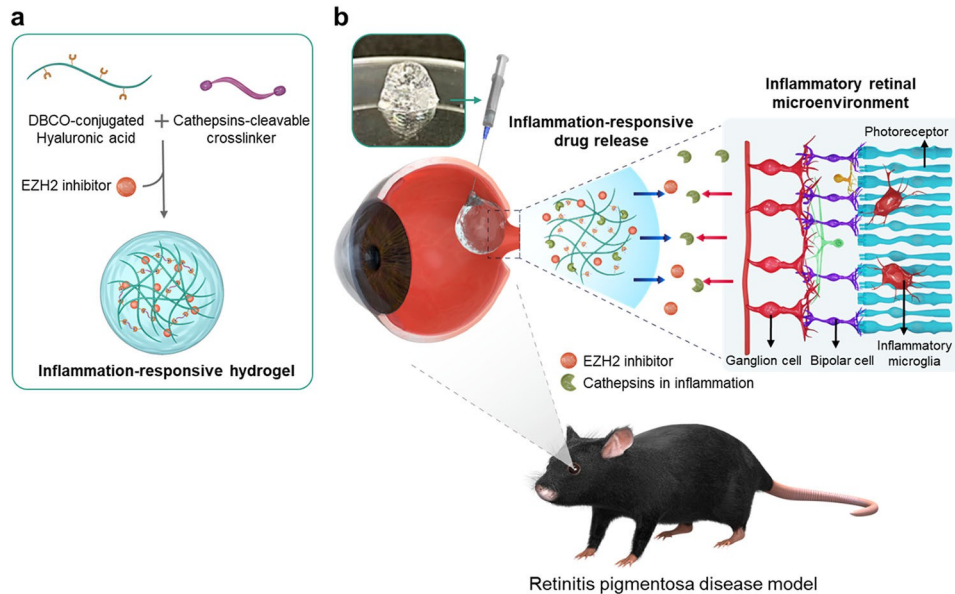


Abb. 2 Schematische Darstellung eines mit einer Spritze injizierbaren, auf Entzündungen reagierenden Hydrogels zur Unterdrückung entzündlicher Mikroglia zur Verhinderung des Absterbens von Photorezeptoren bei Retinitis pigmentosa. a Ein auf Entzündungen reagierendes Hydrogel wird durch Vernetzung von DBCO, das mit Hyaluronsäure konjugiert ist, und Azid eines durch Cathepsine spaltbaren Vernetzers gebildet. b Das EZH2-Inhibitor enthaltende Hydrogel reagiert auf Kathepsine, die in der Entzündungsumgebung der Netzhaut überexprimiert werden, und unterdrückt die Entzündung durch krankheitsabhängig freigesetzten EZH2-Inhibitor aus dem Hydrogel.

wurden mit entzündlichen Mikroglia-Konditionierungsmedien und Kathepsinen inkubiert. Die Dextranfreisetzung aus den Hydrogelen, die unter identischen Bedingungen (c-c-Vernetzerkonzentration von 1 mM und einige andere Bedingungen) hergestellt wurden, wurde 5 Tage lang in vier verschiedenen Lösungen aufrechterhalten: einer phosphatgepufferten Lösung (PBS), Kontrollmedien, nicht-aktivierten Mikroglia-konditionierten Medien (NM CM) und aktivierten Mikroglia-konditionierten Medien (AM CM). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass AM CM die entzündliche Mikroumgebung von RP widerspiegelt, in der entzündliche Mikroglia vorhanden sind. Die Mengen der Dextranfreisetzung in jedem Hydrogel wurden mit In-vivo-Bildgebungssystemen (IVIS) visualisiert (Abb. 4a) und in Form von Balkendiagrammen zusammengefasst (Abb. 4b). Wie in beiden Diagrammen (Abb. 4a, b) zu sehen ist, zeigten die IRHs eine schnelle Freisetzung in den aktivierten Mikroglia-Medien. Die Dextranintensität war in der AM-CM-Gruppe an Tag 3 ($0,55 \pm 0,03$) und Tag 5 ($0,29 \pm 0,07$) signifikant vermindert, während die NM-CM-Gruppe an Tag 3 ($0,98 \pm 0,04$) und Tag 5 ($0,82 \pm 0,06$) keine deutliche Abnahme zeigte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Farbstoff durch das abgebaute IRH-Netzwerk in der entzündlichen Mikroumgebung schnell freigesetzt wird. Das mit einem niedermolekularen EZH2-Inhibitor verkapselte Hydrogel wurde mit einem konditionierten Medium inkubiert, einem Medium für Mikroglia, das einen Tag lang kultiviert wurde. In Übereinstimmung mit den IVIS-Ergebnissen (Abb. 4a) war die Freisetzungsrates des EZH2-Inhibitors in dem konditionierten Medium für aktivierte Mikroglia (AM CM) beschleunigt (Abb. 4c), was auf die Möglichkeit einer bedarfsgerechten Wirkstofffreisetzung in Abhängigkeit von der Schwere der Entzündung hindeutet. Der EZH2-Inhibitor zeigte jedoch aufgrund seines geringen Molekulargewichts eine schnellere Freisetzungsrates als der Dextran-Farbstoff. Darüber hinaus erhöhte ein verwandtes Entzündungsenzym (d. h. Cathepsin L, S und B) die Freisetzung von EZH2-Inhibitoren mit zunehmender Cathepsin-Konzentration (Abb. 4d). In der Kontrollgruppe ohne Kathepsine wurden 5 Tage lang nur ~10 % des EZH2-Inhibitors freigesetzt, während 10 ng/ml Kathepsine eine Freisetzung von ~20 % des EZH2-Inhibitors bewirkten. Im Falle von 100 ng/ml

Kathepsinen wurde sogar noch mehr freigesetzt, ~Etwa 80 % des EZH2-Inhibitors wurden am ersten Tag freigesetzt und erreichten an Tag 5 eine Freisetzung von 100 %. Insgesamt zeigten die IRHs eine aktive Wirkstofffreisetzung als Reaktion auf Entzündungsbedingungen. Wahrscheinlich ist eine wiederholte Injektion des EZH2-Inhibitors mit IRH in klinischen Fällen erforderlich, je nach Wiederauftreten der

Entzündungen; die Injektionshäufigkeit kann jedoch aufgrund der entzündungsansprechenden Eigenschaften unseres Hydrogels erheblich gesenkt werden.

Entzündliche Mikroglia werden durch mit EZH2-Inhibitor beladenes Hydrogel abgeschwächt

Die epigenetische Modulation der retinalen Mikroumgebung wurde als vielversprechende therapeutische Strategie bei verschiedenen degenerativen Erkrankungen der Netzhaut untersucht^{29,30}. Da beispielsweise bekannt ist, dass EZH2 zum Absterben von Stäbchenphotorezeptoren beiträgt⁸ und mikrogliale Entzündungen beiträgt⁹. Da EZH2 bekanntermaßen zum Absterben von Stäbchenphotorezeptoren und zur Mikrogliaentzündung beiträgt, könnte eine selektive Modulation von EZH2 ein günstiger Ansatz für sichere und wirksame therapeutische Ergebnisse bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut sein, die mit Entzündungsaktivitäten einhergehen. Vor der Durchführung von *In-vivo-Experimenten* haben wir *In-vitro-Experimente* durchgeführt, um die entzündungshemmende Wirkung von mit EZH2-Inhibitoren beladenen IRHs auf *entzündliche Mikroglia* zu bestätigen. Um die entzündungshemmende Wirkung der mit EZH2 beladenen IRHs zu testen, verwandelten wir Mikroglia in entzündliche Mikroglia, indem wir TNF- α in einer Konzentration von 50 ng/mL in das Medium einbrachten, und analysierten dann verschiedene entzündliche Aktivierungsmarker. Aufgrund der induzierten Entzündung wurden die mRNA-Spiegel von TNF- α , IL1 β , CCL2 und CCL5 in den aktivierten Mikroglia hochreguliert (Abb. 5a; *siehe* ergänzende Abb. 1 für morphologische Veränderungen der Mikroglia). Im Einklang mit den erhöhten Entzündungsmarkern stieg die Proteinaktivität der Cathepsine L, S und B an (Abb. 5b). Um die entzündungshemmende Wirkung von EZH2-Inhibitoren zu testen, behandelten wir entzündete Mikroglia zunächst mit EZH1/2-Inhibitor (Valemetostat) und EZH2-Inhibitor (Tazemetostat). Beide EZH2-Inhibitoren hemmten wirksam die Entzündungsreaktion der Mikroglia (ergänzende Abb. 2). Auf der Grundlage dieses Ergebnisses wählten wir Tazemetostat für die selektive Hemmung von EZH2 aus. Um die vorübergehende entzündungshemmende Wirkung des IRH zu untersuchen, wurden die entzündlichen Mikroglia einen Tag lang unter vier verschiedenen Bedingungen inkubiert: 1) nur mit Medien (Kontrolle), 2) nur mit Hydrogel (nur Gel), 3) nur mit EZH2-Inhibitor (nur Medikament) und 4) mit EZH2-Inhibitor beladenem Hydrogel (Medikament & Gel) (*siehe* X-Achsen-Titel der Balkendiagramme in Abb. 5c). Wie erwartet, verringerten sowohl die Gruppe "nur Medikament" als auch die Gruppe "Medikament & Gel" die Entzündungsreaktionen in Bezug auf die mRNA

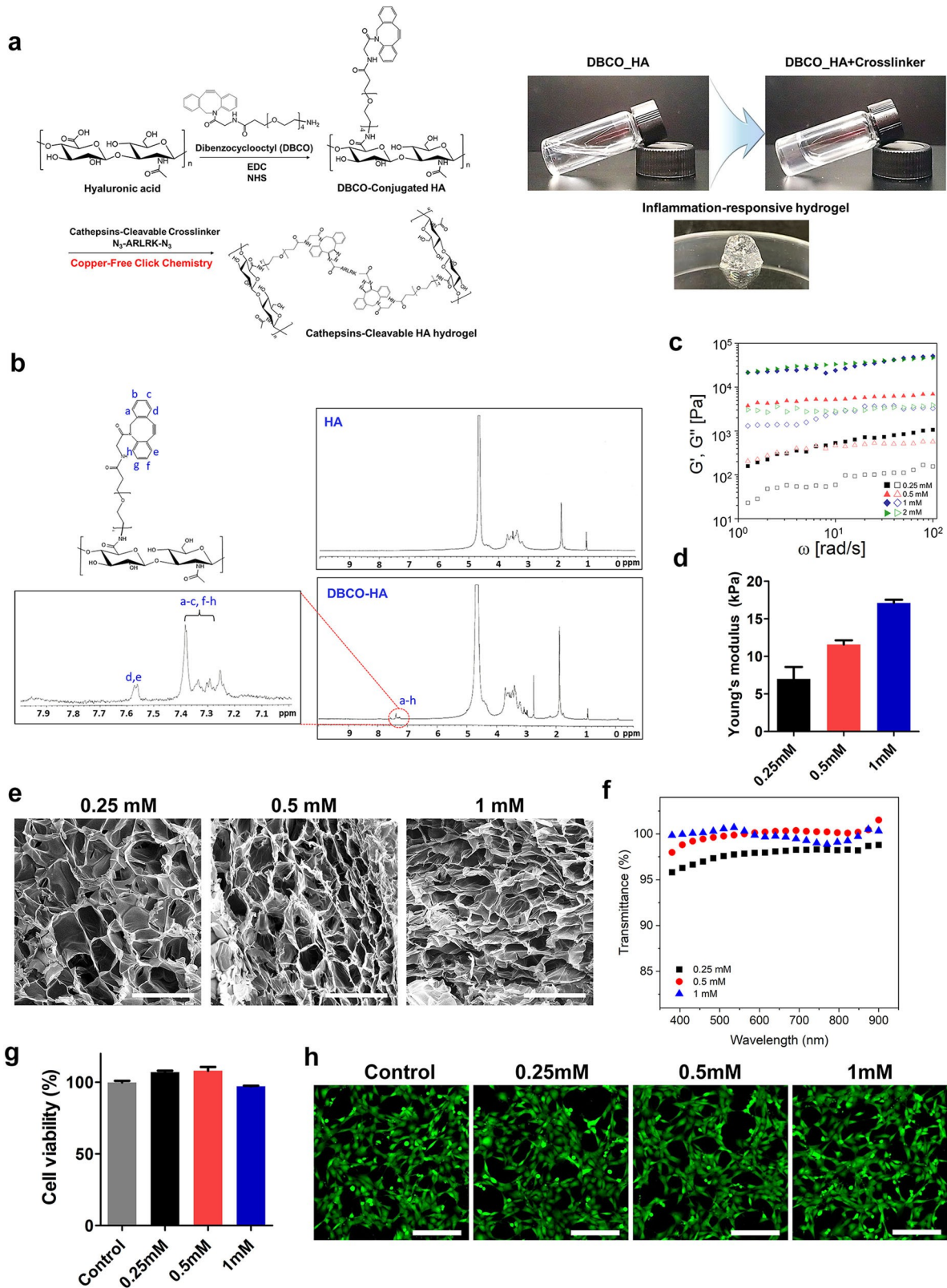


Abb. 3 Charakterisierung eines injizierbaren entzündungsaktiven Hydrogels. **a** Herstellungsschritte eines HA-basierten entzündungsaktiven Hydrogels (IRH). **b** Analyse der chemischen Zusammensetzung mittels¹ H-NMR. **c** Speichermodul (G' ; ausgefüllte Symbole) und Verlustmodul (G'' ; hohle Symbole) von IRHs, die mit vier verschiedenen Konzentrationen (d. h. 0,25, 0,5, 1 und 2 mM) hergestellt wurden. **d** h. 0,25; 0,5; 1; und 2 mM) Cathepsin-spaltbarem Vernetzer hergestellt wurden. **d** Steifigkeit der Hydrogele über den E-Modul-Wert (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **e** Rasterelektronenmikroskopische (REM) Bilder des Hydrogelnetzwerks. Der Maßstab zeigt 200 μm und gilt für alle Bilder. **f** Transmissionswerte von IRHs sind als Funktion der Lichtwellenlänge aufgetragen. **g** Zelllebensfähigkeit von Fibroblasten, die mit Hydrogelen kultiviert wurden. Die kultivierte Schale wurde mit CCK-8-Lösung inkubiert; der Überstand wurde geerntet und die Absorption bei 450 nm gemessen (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **h** Nach der 24-stündigen Kultur mit IRH wurden die Fibroblasten mit dem Cytotoxicity Assay Kit gefärbt. Lebende Zellen sind grün dargestellt, während tote Zellen nicht sichtbar sind; diese sollten rot sein. Der Skalenbalken zeigt

200 μm und gilt für alle Bilder.

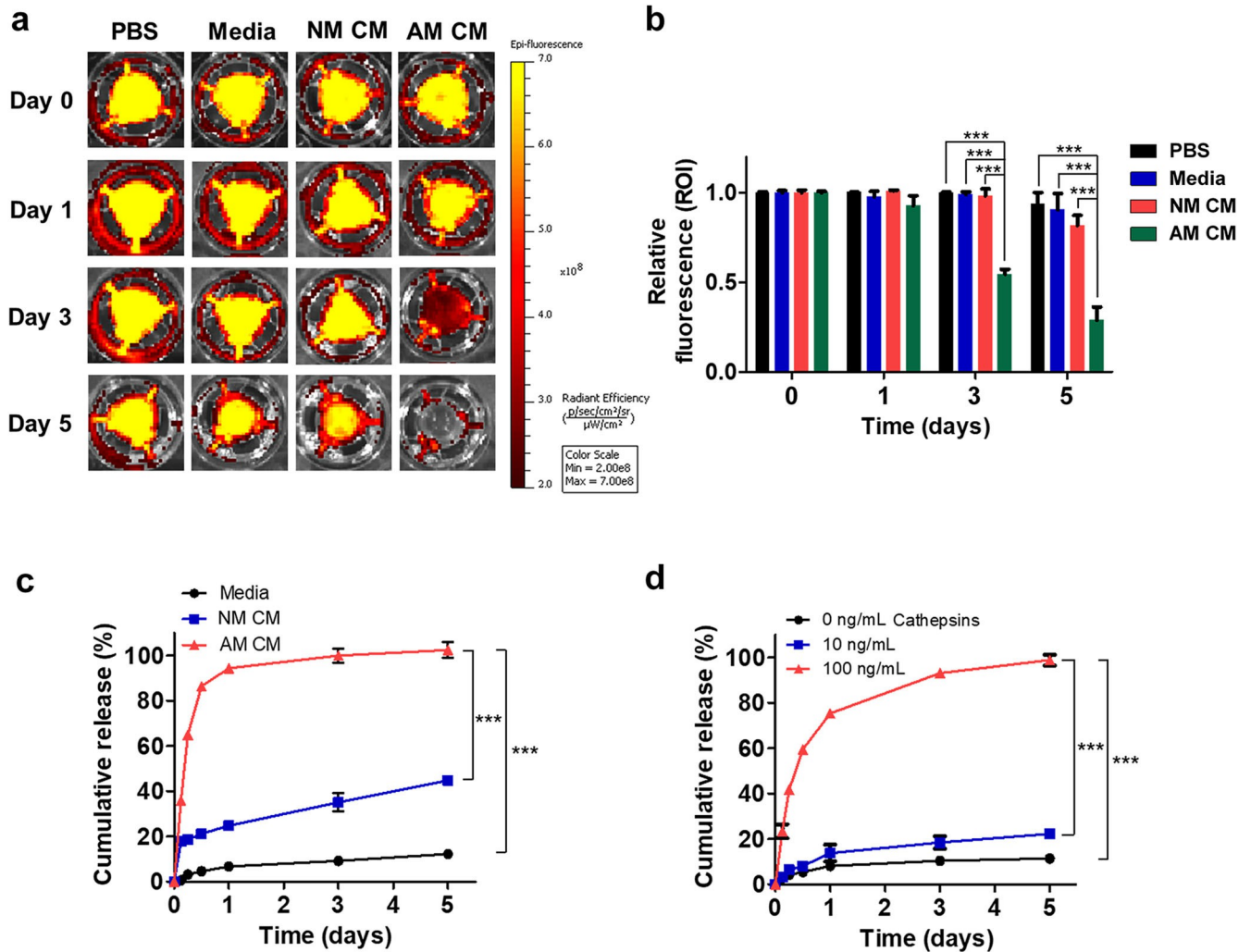


Abb. 4 Verstärkte Freisetzung des EZH2-Inhibitors als Reaktion auf die entzündliche Umgebung. **a** Mit Dextran beladene Hydrogele wurden in PBS, Kontrollmedien, nicht aktivierten konditionierten Mikroglia-Medien (NM CM) und aktivierten konditionierten Mikroglia-Medien (AM CM) inkubiert und mit In-vivo-Bildgebungssystemen (IVIS) abgebildet. **b** Relative Fluoreszenzintensität (Region of interest; ROI) des verbliebenen Dextrans zu jedem Zeitpunkt (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **c** Kumulatives Freisetzungsprofil des EZH2-Inhibitors aus dem Hydrogel in Kontrollmedien, NM CM und AM CM. Der EZH2 enthaltende Überstand wurde bei Raumtemperatur mittels UV-Absorption bei 256 nm gemessen (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die Datenpunkte an Tag 1 zeigen das kurzfristige Freisetzungsprofil. **d** In-vitro-Freisetzungskinetik des EZH2-Inhibitors aus dem Hydrogel in PBS bei 37 °C mit drei verschiedenen Cathepsinkonzentrationen (d. h. 0; 10; und 100 ng/mL) (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mit einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und einem Tukey-Post-Hoc-Test durchgeführt (*** $p < 0,001$).

Expressionsniveaus (rote und grüne Balken in Abb. 5c). Es ist erwähnenswert, dass der EZH2-Inhibitor, der in das Hydrogel geladen wurde (d.h. die Gruppe mit dem Medikament und dem Gel), seine Wirksamkeit nicht verlor und ähnliche entzündungshemmende Wirkungen hatte wie die Behandlung nur mit dem EZH2-Inhibitor (d.h. die Gruppe nur mit dem Medikament); ein statistischer Unterschied zwischen den beiden Gruppen wurde mit Ausnahme von CCL2 nicht festgestellt (vgl. rote und grüne Balken in Abb. 5c).

Um die epigenetische modulierende Wirkung der EZH2-Hemmung auf die Induktion entzündungshemmender Reaktionen weiter zu untersuchen, wurde auch der EZH2-assoziierte Signalweg untersucht. In einer früheren Studie () wurde die IRF1/STAT1-Signalübertragung als ein mit EZH2 assoziierter Signalweg vorgeschlagen, der Entzündungsmediatoren in Mikroglia während der Neuroinflammation beeinflusst⁹. In unserer Proteinanalyse waren die Expressionsniveaus von p-STAT1, STAT1 und IRF1 in der Nur-Gel-Gruppe ähnlich wie in der Kontrollgruppe (vgl. die ersten beiden Spalten von Abb. 5d), was bedeutet, dass die Behandlung nur mit Hydrogel die epigenetische Regulationssignalgebung

nicht beeinflusst hat. Im Gegensatz dazu wurde die Expression der Proteine p-STAT1 und IRF1 in den Gruppen "nur Medikament" und "Medikament & Gel" herunterreguliert, während das Gesamtprotein von

STAT1 wurde beibehalten, was auf eine erfolgreiche Hemmung der IRF1/ STAT1-Expression hinweist (Abb. 5d). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung des EZH2-Inhibitors erhalten bleibt, auch wenn er in das Hydrogel geladen wird. In Übereinstimmung mit früheren Arbeiten zeigten unsere Ergebnisse, dass das mit dem EZH2-Inhibitor beladene Hydrogel die IRF1/STAT1-Expression, die die Entzündungsmediatoren in entzündlichen Mikroglia reguliert, wirksam dämpfte. Insgesamt zeigte das mit EZH2-Inhibitoren beladene IRH das Potenzial für eine entzündungshemmende Therapie in entzündlichen Mikroglia durch die Verringerung der IRF1/STAT1-Signalübertragung, die die Entzündung reguliert (Abb. 5e).

Schutz des Photorezeptorentods durch die entzündungshemmende Wirkung der bedarfsgerechten EZH2-Hemmung entzündlicher Mikroglia

Vor der intraokularen Injektion testeten wir die Injektionsfähigkeit des Hydrogels mit 31 G und 33 G Hamilton-Nadeln: Das Hydrogel war bei allen Vernetzerkonzentrationen wie 0,25, 0,5 und 1 mM injizierbar (ergänzende Abb. 3). Da die IRH-Injektion in den Augapfel den Augeninnendruck (IOD) erhöhen kann, haben wir

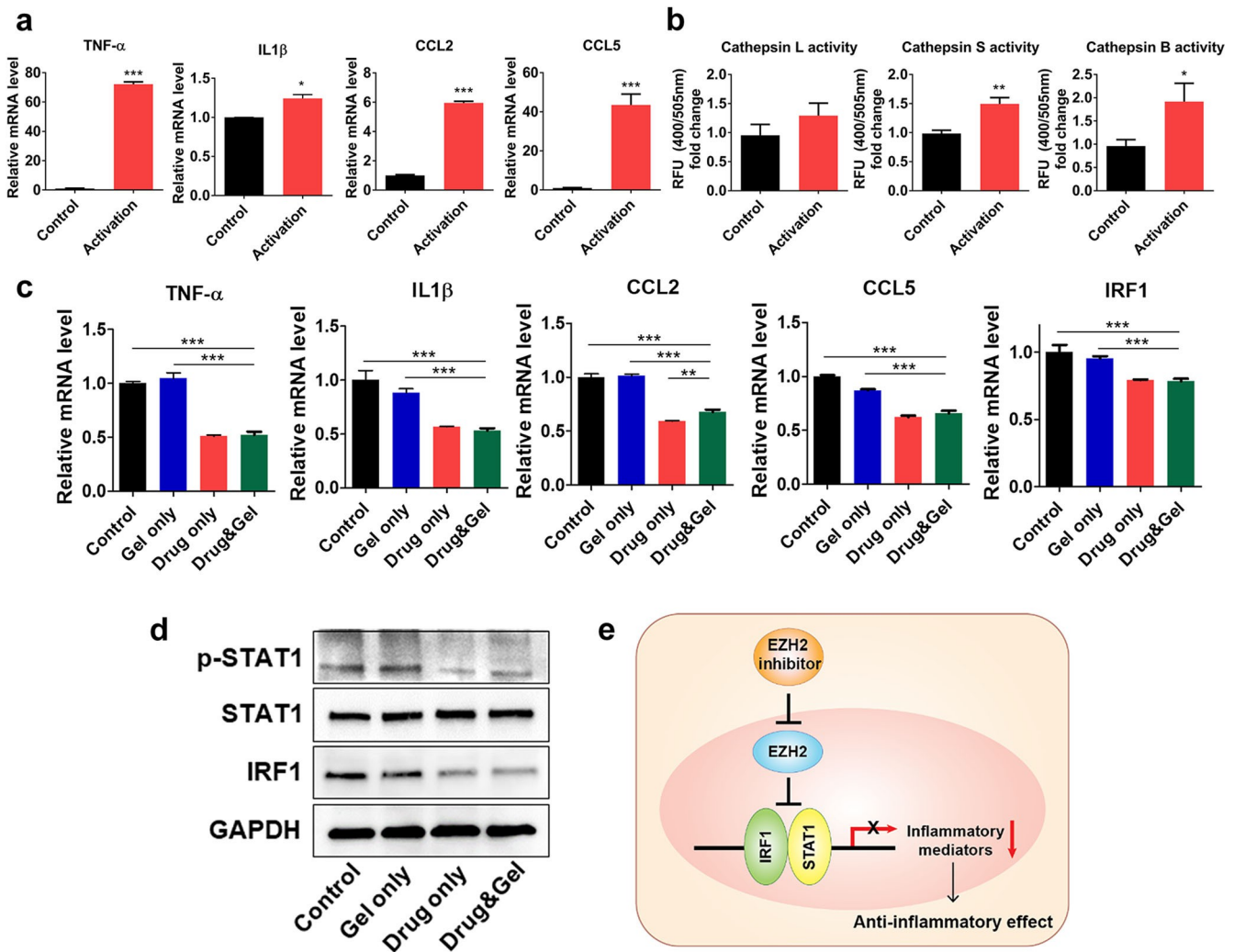


Abb. 5 Mit EZH2-Inhibitor beladenes Hydrogel mit entzündungshemmender Wirkung über epigenetische Modifikation. **a** mRNA-Spiegel von Entzündungsmarkern in Mikroglia und entzündlich aktivierten Mikroglia (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **b** Cathepsin L-, S- und B-Aktivität auf Proteinebene (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). **c** mRNA-Spiegel von Entzündungsmarkern in entzündlich aktivierten Mikroglia, die nur mit Gel, nur mit Medikamenten und mit Medikamenten und Gel behandelt wurden (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mit einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend dem Tukey-Post-Hoc-Test durchgeführt (* $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$). **d** Proteingehalt der mit EZH2 assoziierten Marker in entzündlichen Mikroglia. **e** Schematische Darstellung der mit EZH2-Hemmung verbundenen entzündungshemmenden Signalwege.

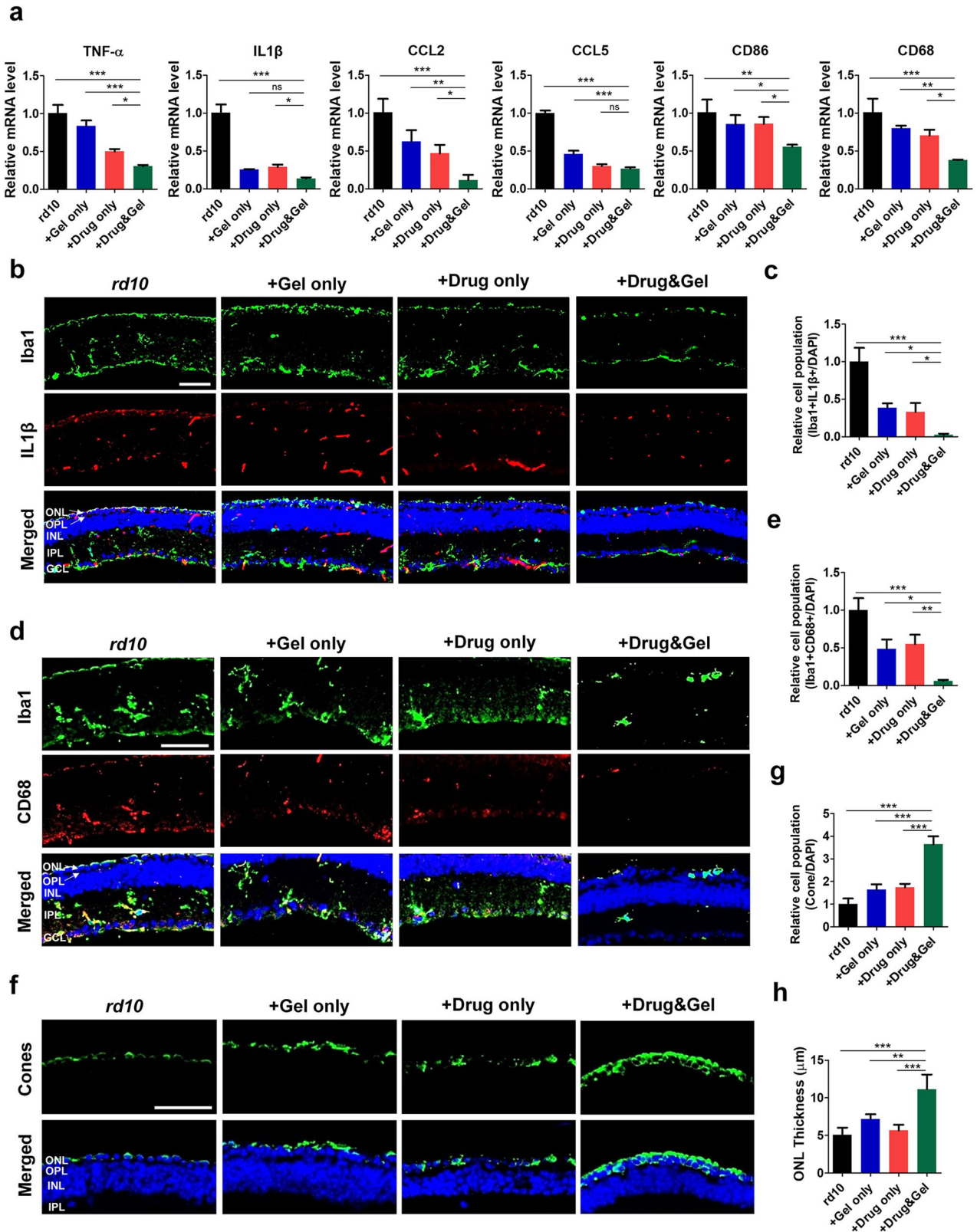
die Augeninnendruckwerte von Mäusen vor und nach der Injektion gemessen. Zunächst wurde 1 μ l des mit einem 1 mM Vernetzer hergestellten Hydrogels in wt- und rd10-Mäuse injiziert (siehe experimenteller Abschnitt); der IOD wurde sowohl nach 3 Stunden Stabilisierung (d.h. Tag 0) als auch nach 2 Wochen (d.h. Tag 14) nach der Injektion analysiert (ergänzende Abb. 4). Obwohl unsere IOD-Messungen keine vorübergehenden Veränderungen zeigen, zeigten die Messungen, dass die IRH-Injektion den IOD nach der Erholung von der Injektion nicht veränderte und sowohl bei Mäusen mit Körpergewicht als auch bei rd10-Mäusen im normalen IOD-Bereich (10-20 mmHg) blieb. Dieses Ergebnis bestätigt, dass es unwahrscheinlich ist, dass die hergestellten IRHs unerwünschte Ereignisse im Zusammenhang mit dem IOD, wie z. B. ein Glaukom, verursachen.

Wir untersuchten die therapeutische Wirksamkeit von EZH2-Inhibitoren.

beladenen IRHs in vivo bei rd10-Mäusen, einem weithin untersuchten RP-Modell. Hydrogel und/oder Arzneimittel wurden den 5 Wochen alten (d.h. postnatale Woche 5 oder PW5) rd10-Mäusen in drei verschiedenen Gruppen intravitreal injiziert: 1) Hydrogele ohne Arzneimittel (nur Gel-Gruppe; $n = 6$), 2) EZH2-Inhibitor in Form einer Lösung ohne Hydrogele (nur Arzneimittel-

Gruppe; $n = 6$) und 3) mit EZH2-Inhibitor beladene Hydrogele (Arzneimittel- und Gel-Gruppe; $n = 6$). 2 Wochen nach der Injektion (d. h. PW7) wurde Netzhautgewebe entnommen und auf genetischer und Proteinebene analysiert, um den Grad der Entzündungsaktivitäten zu untersuchen.

Zunächst wurden die mRNA-Konzentrationen von sechs Entzündungsmarkern (d.h. TNF- α , IL1 β , CCL2, CCL5, CD86 und CD68) für die drei Gruppen, die intravitreale Injektionen erhielten (blaue, rote und grüne Balken in Abb. 6), sowie für die Kontrollgruppe der rd10-Mäuse (keine Injektion; schwarze Balken in Abb. 6) aufgetragen. In Übereinstimmung mit dem vorherigen Ergebnis (Abb. 5c) waren alle Marker sowohl in der reinen Medikamentengruppe als auch in der Medikamenten- und Gelgruppe im Vergleich zur rd10-Gruppe herabreguliert, was auf eine therapeutische Wirkung des EZH2-Inhibitors im In-vivo-Modell hinweist (vgl. schwarze und rot/grüne Balken in Abb. 6a). Wichtig ist jedoch, dass die Entzündungsreaktion noch deutlicher reduziert wurde, wenn der EZH2-Inhibitor und das IRH zusammen verabreicht wurden (vgl. rote und grüne Balken in Abb. 6a), was die erfolgreiche intraokulare Wirkstoffabgabe des Hydrogels belegt. Die bedarfsabhängige Freisetzung des Medikaments durch das Hydrogel kann diese Ergebnisse bewirken, wodurch die therapeutische Wirkung des Medikaments im Auge erhalten bleibt. Die Behandlung nur mit dem Gel führte auch zu entzündungshemmenden Effekten auf der mRNA-Ebene (vgl. schwarze und blaue Balken in Abb. 6a). Dieses Ergebnis deutet auf die entzündungshemmende Wirkung des HA-Hydrogels selbst hin: In einer früheren Studie wurde berichtet, dass das HA-Hydrogel mit hohem Molekulargewicht ($>1,0 \times 10^6$ Da) entzündungsfördernde Rezeptoren wie IL-1R1 und MyD88 abschwächt und so die



entzündliche Reaktion^{31,32}. Daher könnten unsere HA-basierten IRHs aufgrund der entzündungshemmenden Eigenschaften des funktionellen Materials zusätzlich zum EZH2-Inhibitor eine verstärkte entzündungshemmende Wirkung haben, was das HA-Hydrogel als Träger für die bedarfsgerechte Arzneimittelabgabe noch attraktiver macht.

Um die Entzündungsaktivitäten in den Netzhautgeweben zu lokalisieren, führten wir zusätzlich eine Immunfluoreszenzfärbung durch. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die rekrutierten Mikroglia (Iba1) in der Netzhaut in der Gruppe mit dem Medikament und dem Gel am geringsten, aber auch in den beiden Gruppen nur mit dem Gel und nur mit dem Medikament

Abb. 6 Mit EZH2-Inhibitor beladenes IFRep-Gel unterdrückte entzündliche Mikroglia und schützte Photorezeptoren in vivo. a mRNA-Spiegel von Entzündungsmarkern in rd10-Retina (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). b Immunfluoreszenzfärbung von Mikroglia (Iba1) und Entzündungsmarker (IL1 β) in rd10-Retina. ONL Äußere Kernschicht (Photorezeptorzellkörper), OPL Äußere Plexiforme Schicht, INL Innere Kernschicht (Bipolarzellkörper), IPL Innere Plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. c Quantifizierung der entzündlichen Mikroglia (Iba1 + IL1 β +) in den Immunfluoreszenzbildern (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). d Immunfluoreszenzfärbung der Mikroglia (Iba1) und des Phagozytenmarkers (CD68) in der rd10-Netzhaut. e Quantifizierung der entzündlichen Mikroglia (Iba1 + CD68+) in Immunfluoreszenzbildern (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). f Immunfluoreszenzfärbung von überlebenden Zapfenzellen in der rd10-Netzhaut. g Quantifizierung von Zapfenzellen in Immunfluoreszenzbildern (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). h Dicke der äußeren Kernschicht (ONL) nach der Behandlung (Mittelwert \pm SD; $n = 3$). Die statistische Analyse wurde mit einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und anschließendem Tukey-Post-Hoc-Test durchgeführt (* $p < 0,1$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$). Der Maßstabsbalken zeigt 50 μ m und gilt für alle Bilder.

Zeile in Abb. 6b). Die reduzierte Population rekrutierter Mikroglia deutet auf eine verminderte Entzündungsreaktion hin³³. Darüber hinaus war die Anzahl der entzündlichen Mikroglia (gefärbt durch Iba1 und IL1 β) in der Drug & Gel-Gruppe effektiv reduziert (dritte Reihe in Abb. 6b). Die Quantifizierung der entzündlichen Mikroglia-Zellpopulation zeigte eindeutig eine erhebliche Reduktion in der Drug & Gel-Gruppe ($0,023 \pm 0,018$; alle Daten in Abb. 6c, e, g wurden durch die Kontrollgruppe jeder Abbildung normalisiert) (Abb. 6c). Es ist bekannt, dass die Phagozytose von Mikroglia in entzündlichen Umgebungen stattfindet⁴. Daher wurden in den von uns untersuchten Netzhäuten auch phagozytische Mikroglia identifiziert, die sowohl Iba1 als auch CD68 exprimieren (Abb. 6c) und eine deutlich reduzierte Phagozytose aufweisen. Der Anteil der phagozytierenden Mikroglia war am stärksten vermindert, wenn der EZH2-Inhibitor zusammen mit dem IRH verabreicht wurde ($0,061 \pm 0,013$) (Abb. 6e).

Um schließlich zu untersuchen, ob die Photorezeptoren durch unsere

Behandlungen färbten wir die Zapfenzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenzmethoden an (Abb. 6f): wie durch eine viel dickere und hellere grüne Signalbande im Bild oben rechts gezeigt, schienen die Zapfenzellen in der Drug & Gel-Gruppe am meisten verschont zu werden ($3,64 \pm 0,36$). Die weitere Quantifizierung der Zapfenzellen zeigte, dass die Behandlung mit dem Medikament und dem Gel die Überlebensrate der Zapfenzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($1,00 \pm 0,25$) um das Vierfache und im Vergleich zu den Gruppen, die nur mit dem Gel ($1,63 \pm 0,24$) und nur mit dem Medikament ($1,75 \pm 0,15$) behandelt wurden, um das Zweifache erhöhte (Abb. 6g). Wir haben auch die Dicke der äußeren Kernschicht (ONL; in der oberen Reihe von Abb. 6f grün dargestellt) als weiteren Indikator für das degenerative Fortschreiten der RP gemessen. Die Dicke der ONL verringerte sich auf

$5,05 \pm 0,99 \mu$ m in der unbehandelten rd10-Mausgruppe (schwarzer Balken in Abb. 6h), wurde aber in der Drug & Gel-Gruppe bei

$11,15 \pm 1,96 \mu$ m (grüner Balken in Abb. 6h), was nahe an der ursprünglichen ONL-Dicke zum Zeitpunkt der Behandlung ($\sim 13,25 \mu$ m) liegt (ergänzend Abb. 5). All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Behandlung mit Drug & Gel das pathologische Fortschreiten der degenerativen Erkrankung der Netzhaut wirksam verzögert und die Zapfenzellen gerettet hat. Insgesamt kann die bedarfsgerechte Verabreichung von EZH2-Inhibitoren mit dem IRH den durch RD verursachten Sehverlust wirksam lindern.

Bestätigung der verzögerten Netzhautdegeneration durch die lichtinduzierte Reaktion in der Netzhaut

In der Netzhaut wandeln Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren Lichtsignale in physiologische Signale um. Anschließend führen ihre postsynaptischen Neuronen wie bipolare, horizontale und amakrine Zellen komplexe neuronale Berechnungen durch. Die letzte Stufe in der Netzhaut bilden die retinalen Ganglienzellen (RGC), die visuelle Informationen in Form von Spike Trains an das Gehirn weiterleiten. Daher verändert die Degeneration bzw. das Absterben von Photorezeptorzellen die Spike-Aktivitäten der

RGCs erheblich. Um die mögliche Verzögerung des Verlusts der physiologischen Sehfunktion nach unserer Behandlung mit IRHs zu untersuchen, wurden die durch Licht hervorgerufenen Reaktionen von RGCs von rd10-Mäusen aufgezeichnet, die nicht mit Gel, nur mit Medikamenten und mit Medikamenten und Gel behandelt wurden (Abb. 7a). Als Reaktion auf stationäre, 1 Sekunde lange weiße Fleckenblitze wurden in den RGCs der mit Drug & Gel behandelten Mäuse durchweg Spiking-Antworten ausgelöst, und die Antworten waren stark genug, um die meisten RGCs (24 Zellen von 27 aufgezeichneten Zellen) eindeutig entweder dem ON- oder dem OFF-Typ zuzuordnen (unteres Rasterdiagramm in Abb. 7a). Die nur mit rd10 und Medikamenten behandelten

Gruppen zeigten spontane Spike-Aktivitäten während der gesamten Aufzeichnungsperiode oder ein Bündel von Spikes im Zeitverlauf (erste und dritte Rasterplots in Abb. 7a). Diese Ergebnisse sind repräsentativ für die in degenerierten Netzhäuten beobachteten Phänomene, von denen bekannt ist, dass sie auf Fluktuationen im Zellmembranpotenzial der RGCs zurückzuführen sind^{34,35}. Im Gegensatz zu den Gruppen *rd10* und *Drug only* war es möglich, den RGC-Typ (d. h. ON oder OFF) in einigen Zellen der Gruppe *Gel only* zu unterscheiden (zweiter Rasterplot in Abb. 7a). Es gibt jedoch auch RGCs, die überhaupt nicht auf den Lichtreiz reagierten, wie in der *rd10*- und der *Nur-Drogen*-Gruppe.

Für eine quantitativere Analyse berechneten wir auch die Anzahl der Spikes und die Spitzenfeuerungsrate (PFR) der Lichtreaktionen (Abb. 7b, c; siehe experimenteller Abschnitt). Die RGCs der *Drug & Gel*-Gruppe erzeugten im Durchschnitt $11,57 \pm 11,59$ Spikes und zeigten eine PFR von $70,06 \pm 40,57$ Hz im Durchschnitt. Im Gegensatz dazu waren die durchschnittlichen Spike-Zahlen der *rd10*-, *Nur-Gel*- und *Nur-Droge*-Gruppen ($6,30 \pm 11,07$, $9,44 \pm 12,70$ bzw. $2,17 \pm 3,01$ Spikes) relativ niedriger als die der mit *Droge & Gel* behandelten Mäuse (Abb. 7b). Obwohl nur eine statistische Signifikanz in der Anzahl der Spikes zwischen der reinen Medikamentengruppe und der Medikamenten- und Gelgruppe gefunden wurde ($p < 0,05$), zeigten die PFR-Analysen aufgrund der erhöhten spontanen Spike-Aktivitäten (Abb. 7d) eine deutliche statistische Signifikanz im Vergleich zur Medikamenten- und Gelgruppe. Die durchschnittlichen PFRs der *rd10*- ($22,48 \pm 20,90$ Hz; $p < 0,05$) und der *Nur-Droge*-Gruppe ($15,33 \pm 14,96$ Hz; $p < 0,01$) waren signifikant niedriger als die der Gruppe mit Medikament und Gel ($70,06 \pm 40,57$ Hz). Im Fall der *Nur-Gel*-Gruppe war jedoch aufgrund der beiden Ausreißer-RGCs (in Abb. 7c mit blauen Pfeilen markiert) die durchschnittliche PFR höher als die der anderen Gruppen, und auch die Standardabweichung war hoch ($77,35 \pm 110,18$ Hz). Ohne diese beiden Ausreißer reduzierte sich die PFR auf $42,83 \pm 39,54$ Hz. Bei den Analysen der Spiking-Aktivität ist besonders bemerkenswert, dass die Gruppe, die nur das Medikament erhielt, nicht die gespeicherten physiologischen Funktionen der Photorezeptoren zeigte (vgl. rote und grüne Diagramme in Abb. 7b, c). Dies steht im Gegensatz zu den ähnlichen entzündungshemmenden Effekten zwischen der *Nur-Droge*- und der *Droge & Gel*-Gruppe, die in den mRNA- und Immunfluoreszenz-Assays sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bestätigt wurden (Abb. 5 und 6). Die verbesserte Fähigkeit zum Schutz der Photorezeptorfunktionen durch die Behandlung mit dem Medikament & Gel könnte auf die langsame Wirkstofffreisetzung des IRH zurückzuführen sein (Abb. 4).

Es ist bekannt, dass die mehrfache Wiederholung eines identischen Reizes in der gesunden Netzhaut konsistente Spike-Aktivitäten hervorruft (d.h. ähnliche Spike-Züge entstehen bei verschiedenen Wiederholungen), während die Konsistenz in der degenerierten Netzhaut reduziert ist³⁶. Um die Konsistenz der Lichtreaktionen, die wir von den fünf repräsentativen RGCs aufgezeichnet haben, von Versuch zu Versuch zu visualisieren, haben wir die Spike-Aktivitäten aufgetragen, die durch sieben verschiedene Wiederholungen eines identischen Lichtreizes hervorgerufen wurden (Abb. 8a). Die Gruppen *rd10*, *nur Gel* und *nur Drug* zeigten schwache und inkonsistente Spike-Muster als Reaktion auf dieselben Lichtreize (Abb. 8a). Wir berechneten auch die Spike-Time-Tiling-Koeffizienten (STTCs) (siehe Gleichung (1) im experimentellen Abschnitt) über diese Wiederholungen in jedem RGC und stellten dann die STTC-Matrizen für alle gemessenen RGCs dar (Abb. 8b). Wie in den ersten drei Unterabschnitten von Abb. 8b zu sehen ist, waren die schwarzen Bereiche der STTC-Wärmekarten, die auf fehlende Spike-Aktivität hinweisen, in allen Gruppen mit Ausnahme der Medikamenten- und Gel-Gruppe größer. Um den Anteil der nicht reagierenden RGCs in jeder Gruppe zu quantifizieren,

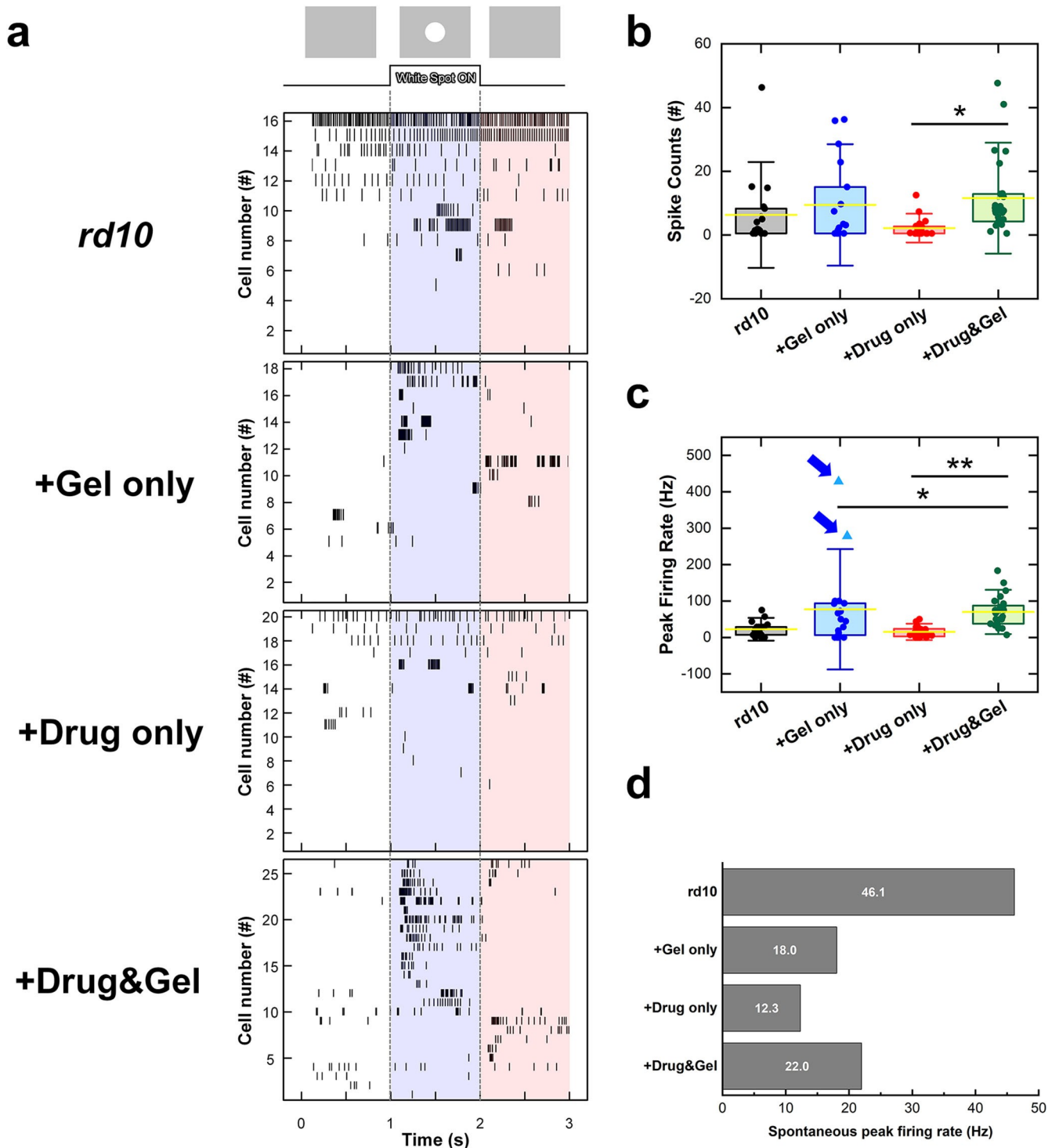


Abb. 7 Lichtevozierte Spike-Aktivitäten der Kontroll-, Gel-, Medikamenten- und Medikamenten- und Gel-Gruppen. **a** Die Rasterdiagramme der einzelnen Gruppen. Der 1 Sekunde lange weiße Spot wurde auf die Photorezeptorschicht der Zielzellen projiziert. Das blaue vertikale Band zeigt die Zeitspanne an, in der der Fleck geblitzt wurde, und die ausgelösten Spikes bedeuten die EIN-Reaktion. Im Gegensatz dazu zeigt das rote vertikale Band die AUS-Antworten an. Die Kontrollgruppe (18 Zellen aus 2 Netzhäuten), die Nur-Gel-Gruppe (18 Zellen aus 2 Netzhäuten) und die Nur-Droge-Gruppe (20 Zellen aus 4 Netzhäuten) zeigten spontanes Feuere oder stille Reaktionen. Die Gruppe "Drug & Gel" (27 Zellen aus 3 Retinas) zeigte jedoch relativ ausgeprägte ON- oder OFF-Antworten. **b** Spike-Zahlen und **c** Spitzenfeuerungsrate einer aufgezeichneten RGC in jeder Gruppe. Zwei Ausreißerzellen der Gel-Gruppe wurden mit den blauen Pfeilen markiert. Gelbe Balken stellen Mittelwerte und Fehlerbalken dar.

bezeichnen SDs. Die statistische Signifikanz wurde anhand der einseitigen ANOVA mit Holm-Sidak-Post-Hoc-Vergleichen bewertet ($p < 0,05$ und $**p < 0,01$).

d Maximalwert der spontanen Spitzenfeuerungsrate, berechnet in jedem 20 ms langen Bin.

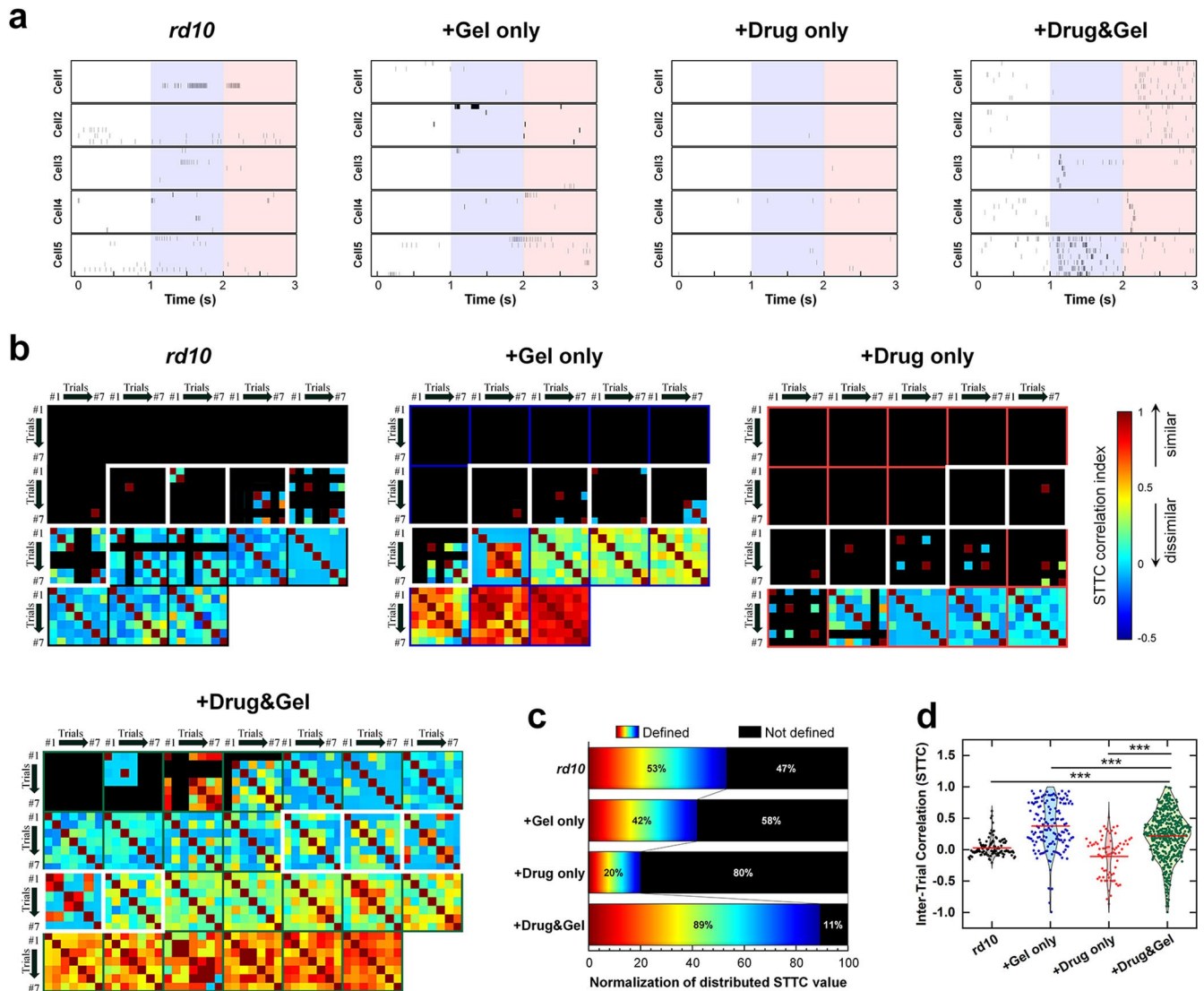


Abb. 8 Spike-Timing-Konsistenz der licht-erregten Antworten auf 7 Wiederholungen eines identischen Lichtreizes von *rd10*, nur Gel, nur Medikament und Medikament & Gel Gruppen. a Rasterantworten von 5 repräsentativen RGCs aus jeder Gruppe. b Farbkodierte Heatmaps der Spike-Time-Tiling-Koeffizienten (STTCs) der licht-erregten Antworten für jede Gruppe. Jedes Kästchen mit einer farbigen, durchgezogenen Linie bedeutet STTC-Werte in einer bestimmten Zelle. Die schwarze Farbe in den Matrizen zeigt an, dass in diesen Versuchen keine Spike-Aktivität ausgelöst wurde. c Prozentualer Anteil der definierten und nicht definierten STTC-Werte in jeder Gruppe. Die Anzahl der definierten/nicht definierten STTC-Werte wurde entsprechend der Gesamtzahl der RGCs und ihrer Lichtstimulationswiederholungen normalisiert. d Violinplot, der die Verteilung der STTCs in jeder Gruppe zeigt. Die Datenpunkte zeigen die STTC-Werte jedes Pixels in den STTC-Matrizen in Feld b. Die roten horizontalen durchgezogenen Linien stellen die durchschnittlichen STTC-Werte jeder Gruppe dar. Die statistische Signifikanz wurde anhand des einseitige ANOVA mit Holm-Sidak-Post-hoc-Vergleichen (***) $p < 0,001$). Alle in Abb. 7 aufgeführten Zellen wurden auch in Abb. 8 verwendet.

und undefinierte STTC-Werte und normalisierte sie dann entsprechend der Anzahl der aufgezeichneten RGCs (Abb. 8c). Obwohl STTCs immer noch in etwa der Hälfte der RGCs von *rd10*-Mäusen berechnet wurden (erste Zeile in Abb. 8c), lag dies in erster Linie an den erhöhten spontanen Aktivitäten (Abb. 7d): die spontanen Spitzenfeuerungsraten betragen 46,1, 18,0, 12,3 und 22,0 Hz in den Gruppen *rd10*, nur Gel, nur Medikament und Medikament & Gel. Insbesondere die höheren Spontanaktivitäten führten im Durchschnitt zu STTCs nahe Null (schwarzer Plot in Abb. 8d). In scharfem Kontrast dazu waren die STTCs in den meisten RGCs der Drug & Gel-Gruppe gut definiert (STTC-Werte waren in 89 % aller Aufzeichnungspaare definiert, wie in der letzten Zeile von Abb. 8c gezeigt); die durchschnittliche STTC war auch höher als die der Kontrollgruppe ($0,22 \pm 0,37$ und $0,03 \pm 0,14$ für die Gruppen Drug & Gel bzw. *rd10*; Abb. 8d).

Auch hier ist es erstaunlich, dass die Behandlung nur mit

Medikamenten in den Analysen zur Reaktionskonsistenz schlecht abschneidet, sogar noch schlechter als das Ergebnis der Behandlung nur mit Gel.

npj Gruppe (vgl. die mittleren beiden Zeilen/Spalten in Abb. 8c, d).
Dieser Trend steht im Einklang mit unseren Analysen der ^{H. Kim et al.}

20 Reaktionsgröße (Abb. 7b, c). Diese Ergebnisse haben möglicherweise zwei Auswirkungen: 1) Die einmalige Injektion des EZH2-Inhibitors ist möglicherweise therapeutisch nicht wirksam, wahrscheinlich aufgrund der schnellen Clearance im hinteren Teil des Körpers.¹⁰ und 2) die Langzeitimplantation eines HA-basierten Hydrogels kann die physiologische Funktion der Photorezeptoren schützen, möglicherweise durch die verringerte Entzündungsaktivität (Abb. 6). Tatsächlich war die durchschnittliche STTC der Nur-Gel-Gruppe sogar höher als die der Wirkstoff-Gel-Gruppe ($0,38 \pm 0,40$ und $0,22 \pm 0,37$ für die Nur-Gel- bzw. die Wirkstoff-Gel-Gruppe; Abb. 8d). Dieses erhöhte Ergebnis ist jedoch auf die beiden Ausreißerzellen zurückzuführen, die wir in der PFR-Analyse erwähnt haben (Abb. 7c). Sie zeigten rot gefärbte STTC-Matrizen (die letzten beiden des zweiten Unterpanels in Abb. 8b) und Datenpunkte, die im Violinplot (blauer Graph in Abb. 8d) in der Nähe von 1 gruppiert waren. Abgesehen von diesen beiden RGCs zeigten die meisten RGCs in der Nur-Gel-Gruppe keine lichtevozierten

und ist damit der zweithöchste Prozentsatz an undefinierten STTC-Werten (d. h. 58 % aller Versuche) (Abb. 8c).

In Abb. 8c war der Prozentsatz der definierten STTC-Werte in der Kontrollgruppe (53 %) höher als in den Gruppen "nur Gel" (42 %) und "nur Medikament" (20 %). Das lag vor allem daran, dass die spontanen Aktivitäten in den Gruppen *rd10* und Drug & Gel relativ höher waren (Abb. 7d). Wie bereits erwähnt, war jedoch die berechnete durchschnittliche STTC der *rd10*-Gruppe aufgrund der inkonsistenten Reaktionen niedrig. Obwohl mehrere RGCs der Drug & Gel-Gruppe auch spontane Aktivitäten während der Zeit vor dem Lichtreiz zeigten (Abb. 7a), waren die durch das Licht hervorgerufenen Reaktionen nach dem Lichtreiz relativ stark und konsistent.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Behandlung mit einem IRH, das mit einem EZH2-Inhibitor beladen ist, den Abbau der physiologischen Funktionen der Netzhaut effektiv verlangsamen kann, zusätzlich zu den verringerten Entzündungsaktivitäten, die beide durch RP entstehen. Ähnlich wie in unserer Studie gab es mehrere Versuche, die Morphologie und Funktion der Netzhaut während der RD mit verschiedenen Methoden wie elektrischer Stimulation zu erhalten^{37,38}. Wiederholte intravitreale Medikamenteninjektion^{4,7,39} oder Genom-Editierung^{40,41}. Diese Methoden weisen jedoch einige Nachteile auf, darunter die häufige Anwendung von elektrischen Impulsen^{37,38} und wiederholte Injektionen³⁹ sowie die geringe Transfektionseffizienz der Virusvektoren. Die Einzigartigkeit unserer Studie im Vergleich zu den bestehenden Literatur, ist, dass die Behandlung Wirkung wurde für einen langen Zeitraum durch das Laden der Droge in IRH sowie die geschützten physiologischen Funktionen der Netzhaut wurden auf der Ebene der einzelnen Spike in jedem RGC mit einem Patch-Clamp-Aufnahme-Technik untersucht beibehalten. Es scheint jedoch unklar zu sein, ob die Behandlung den retinalen Schaltkreis erhalten kann, der an der Bildung visueller Wahrnehmungen beteiligt ist. Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass wir mit der Behandlung bei PW5 begonnen haben. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Beginn der Behandlung in einem früheren Degenerationsstadium (z. B. bei *rd10*-Mäusen bei PW3) zu einem günstigeren Ergebnis geführt hätte. Leider war es jedoch aufgrund der geringen Größe des Augapfels nicht möglich, IRH früher als 3 Wochen zu injizieren, was in klinischen Fällen nicht der Fall wäre, da menschliche Augäpfel viel größer sind als die von Mäusen. In Zukunft scheint es notwendig zu sein, die entzündungshemmende Wirkung zu verstärken, um den retinalen Schaltkreis für anspruchsvolle neuronale Berechnungen intakter zu erhalten, indem die Konzentration des Medikaments, der Zeitpunkt der Injektion usw. optimiert wird. Darüber hinaus kann das auf Entzündungen reagierende Hydrogel auf Krankheitszustände reagieren, aber für die klinische Anwendung ist eine langfristige Wirkstofffreisetzung erforderlich. Das fortschrittliche, auf Entzündungen reagierende Hydrogel kann durch die Optimierung der Konzentration des Kathepsin-spaltbaren Vernetzers und der mechanischen Eigenschaften des Hydrogels in zukünftigen Studien entwickelt werden. Obwohl es fast unmöglich ist, die RD mit unserem Ansatz rückgängig zu machen, wäre eine Verlangsamung/Stilllegung der Degeneration der Netzhaut für mikroelektronische Netzhautprothesen von Vorteil, da unsere früheren Studien mit RGCs der gesunden Netzhaut günstige Reaktionsmerkmale auf elektrische Stimulation, wie z. B. Natürlichkeit der Spiking-Aktivitäten und erhöhte ON/OFF-Zelltyp-Spezifitäten, für hochwertiges künstliches Sehen gezeigt haben⁴².

DISKUSSION

In dieser Studie wurde ein entzündungsempfindliches Hydrogel auf HA-Basis für eine bedarfsgerechte entzündungshemmende Therapie bei einer degenerativen Erkrankung der Netzhaut entwickelt. Das auf Entzündungen reagierende Hydrogel setzte das Medikament in Abhängigkeit von verschiedenen

Kathepsinkonzentrationen und Entzündungsbedingungen kontrolliert frei. Unsere In-vitro-Experimente zeigten, dass das Hydrogel aufgrund seiner Eigenschaften wie Injektionsfähigkeit, Biokompatibilität und Transparenz für die intraokulare Injektion geeignet ist. Außerdem wurde durch die epigenetische Modulation des aus dem Hydrogel freigesetzten EZH2-Inhibitors eine entzündungshemmende Wirkung auf entzündliche Mikroglia erzielt. Die intravitreale Injektion des mit EZH2-Inhibitor beladenen Hydrogels bei Mäusen mit äußerer Netzhautdegeneration (*rd10*) induzierte

eine entzündungshemmende Wirkung in der Netzhautumgebung und schützte den Zapfenzelltod der Photorezeptoren. Insbesondere die Ergebnisse der Ganglienzellreaktion zeigten eine verzögerte Netzhautdegeneration und einen Sehverlust im rd10-Mäusemodell. Insgesamt zeigte das auf HA basierende entzündungsreagierende Hydrogel eine effiziente Medikamentenabgabe entsprechend der Krankheitsaktivität für die entzündungshemmende Therapie. Diese therapeutische Strategie deutet auf ein wirksames Behandlungspotenzial bei fortschreitender degenerativer Erkrankung der Netzhaut hin. Die in dieser Studie entwickelte Hydrogel-Plattform kann bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden, die eine minimalinvasive Behandlung in Kombination mit verschiedenen Medikamenten erfordern. Für klinische Anwendungen sind weitere Studien erforderlich, um auf Entzündungen reagierende Hydrogele zu entwickeln, die die Krankheit aktiv kontrollieren und eine langfristige Freisetzung von Medikamenten ermöglichen.

METHODEN

Herstellung von Dibenzocyclooctyne-konjugierter Hyaluronsäure (DBCO-HA)

Hyaluronsäure (HA, 2 M Da; SK Bioland, Seoul, Südkorea) wurde in DMSO:destilliertem Wasser (1:1) in einer Konzentration von 0,5 Gew.-% aufgelöst. Anschließend wurden 0,6 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-Hydrochlorid (EDC) in der HA-Lösung aufgelöst, gefolgt von 0,6 mM N-Hydroxysuccinimid (NHS), das 30 Minuten lang in der Lösung gelöst wurde. Zu der vorbereiteten Lösung wurden langsam 0,4 mM DBCO-PEG4-Amin (#A103P, Click Chemistry Tools, Scottsdale, USA) hinzugefügt; die Reaktion wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gehalten. Nach Beendigung der Reaktion wurde die Lösung in ein Dialyseröhrchen mit einem Molekulargewichts-Cut-off (MWCO) von 25 kDa überführt und 3 Tage lang in deionisiertem Wasser (DI) dialysiert. Das Dialysat wurde alle 10 Stunden gewechselt. Die DBCO-konjugierte HA-Lösung (DBCO-HA) wurde durch einen 0,22- μ m-Spritzenfilter sterilisiert und 3 Tage lang gefriergetrocknet. Die erfolgreiche Konjugation von DBCO an HA wurde durch Protonen-Kernresonanzspektroskopie (1 H-NMR) bestätigt (die Probenkonzentration der DBCO-HA-Lösung wurde mit 2 Gew.-% in Deuteriumoxid hergestellt).

Herstellung eines durch Kathepsine spaltbaren vernetzten DBCO-HA-Hydrogels

Der Kathepsin-spaltbare Peptidvernetzer, Azidoacetyl-ARLRK-Azidoacetyl (MW: 808,51 Da, Reinheit: 99 %; Modellnummer, Peptron, Daejeon, Südkorea), wurde auf der Grundlage unserer früheren Veröffentlichung entwickelt²³. Nachdem 2 Gew.-% DBCO-HA in DI-Wasser aufgelöst worden waren, wurde der durch Kathepsine spaltbare Vernetzer in verschiedenen Konzentrationen zugegeben: 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM. Das Lösungsgemisch wurde 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert.

Messung mechanischer Eigenschaften

Die Rheologie des hergestellten Hydrogels wurde mit einem Rheometer (Anton Paar, Graz, Österreich) analysiert. Die Messungen wurden bei oszillierenden Frequenzen von 0,1 bis 100 rad/s bei 0,1 % Dehnung bei Raumtemperatur durchgeführt. Sowohl der Speichermodul (G') als auch der Verlustmodul (G'') wurden mit der Software des Rheometers berechnet. Auch die Steifigkeit des Hydrogels wurde mit dem Instron (Instron 5900, Instron Corporation, Norwood, Massachusetts, USA) analysiert. Durch Zusammendrücken des Hydrogels wurde die

Spannungs-Dehnungs-Kurve gemessen, und dann wurde der Elastizitätsmodul als die Steigung des linearen Bereichs (erste 10 % der Dehnung) in dieser Spannungs-Dehnungs-Kurve ermittelt.

Rasterelektronenmikroskopische (SEM) Aufnahmen: Die gefriergetrockneten

Hydrogele wurden in flüssigen Stickstoff getaucht, um beim Schneiden klare Querschnitte der Proben zu erhalten. Die gefrorenen Proben wurden mit einer Klinge geschnitten. Dann wurden die geschnittenen Proben auf ein Kohlenstoffband gelegt und die Oberfläche mit Platin beschichtet, bevor sie in ein REM (Teneo VSTM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) geladen wurden, das die präparierten Proben abbildete.

Tabelle 1. Liste der Primersequenzen, die in den Echtzeit-PCR-Experimenten der vorliegenden Studie verwendet wurden.

Gen	Vorwärts (5' → 3')	Rückseite (3' → 5')
hGAPDH	CACCATTGGCAATGAGCGGTTCC	AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT
hTNF- α	GTGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	GCCATAGAAGTATGAGAGGGA
hIL1 β	CCACAGACCTCCAGGAGAATG	GTGCAGTTCAGTATCGTACAGG
hCCL2	AGAATCACCAGCAGCAAGTGCC	TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG
hCCL5	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	ACACACTTGGCGGTTCTTTCGG
hCD86	CCATCAGCTTGTCTGTTTCATTCC	GCTGTAATCCAAGGAATGTGGTC
hCD68	CGAGCATCATTCTTCCACCAGCT	ATGAGAGGCAGCAAGATGGACC
hCathepsin L	GAAAGGCTACGTGACTCCTGTG	GTCTACCAGATTCTGCTCACTC
hCathepsin S	TGGATCACCAGTGGCATCTCTG	GCTCCAGGTTGTGAAGCATCAC
hCathepsin B	GCTTCGATGCACGGGAACAATG	CATTGGTGTGGATGCAGATCCG
mGAPDH	CATCACTGCCACCACCCAGAAGACTG	ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
mTNF- α	GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT	GCCATAGAAGTATGAGAGGAG
mIL1 β	TGGACCTCCAGGATGAGGACA	GTTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
mCCL2	GCTACAAGAGGATCACCAGCAG	GTCTGGACCCATTCTTCTTGG
mCCL5	CCTGCTGCTTTGCCTACCTCTC	ACACACTTGGCGGTTCTTTCGA
mCD86	ACGTATTGGAAGGAGATTACAGCT	TCTGTCAGCGTTACTATCCCGC
mCD68	GGCGGTGGAATAACAATGTGTCC	AGCAGGTCAAGGTGAACAGCTG
mCathepsin L	GGAAAATGGAGGTCTGGACTCG	GTGTCAATGACCACAGCGAAGCTC
mCathepsin S	GCATAGAGGCAGACGCTTCTTA	CCACTGCTTCTTTCAGGGCATC
mCathepsin B	AGTCAACGTGGAGGTGTGTCTGCT	GTAGACTCCACACCTGAAACCAAG

Charakterisierung des Freisetzungsprofils von Arzneimitteln aus einem entzündungsempfindlichen Hydrogel

Dextran (MW: 4 kDa) wurde in das Hydrogel geladen, um die Farbstofffreisetzungsraten bei verschiedenen Konzentrationen von Kathepsinen zu quantifizieren. Die mit Dextran beladenen Hydrogele wurden in drei 24 Transwell-Einsätzen platziert und in Kontrollmedien (DMEM/F-12-Medien), konditionierten Mikroglia-Medien und aktivierten Mikroglia in DMEM/F-12-Medien inkubiert, die alle bei 37 °C gehalten wurden. Das konditionierte Mikroglia-Medium wurde durch Kultivierung von Mikroglia in DMEM/F-12 für

1 Tag. Ein konditioniertes Medium für aktivierte Mikroglia wurde durch Induktion entzündlicher Mikroglia mit 50 ng/ml TNF- α (#210-TA, R&D System) in DMEM/F-12 für 1 Tag hergestellt. Das konditionierte Medium der aktivierten Mikroglia wurde aus dem Überstand des Kultivierungsmediums in DMEM/F-12 für 1 Tag geerntet. Die Einsätze wurden in eine neue 24-Well-Platte übertragen, und die Fluoreszenzintensität wurde mit einem In-vivo-Bildgebungssystem (IVIS, Caliper Life Sciences, Waltham, Massachusetts, USA) zu den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 5 Tage gemessen. Darüber hinaus wurden die mit EZH2-Inhibitoren, Tazemetostat (EPZ-6438, Selleck-Chem, Houston, Texas, USA), beladenen Hydrogele in einem Kontrollmedium (DMEM/F-12-Medium), konditionierten Mikroglia-Medien und aktivierten Mikroglia in DMEM/F-12-Medien kultiviert, die alle bei 37 °C gehalten wurden. Die Überstände wurden zu den Zeitpunkten 0,125, 0,25, 0,5, 1, 3 und 5 Tage gesammelt und über die Absorptionsrate von Ultraviolett (UV) bei 256 nm quantifiziert. Anschließend untersuchten wir die Freisetzungsprofile des EZH2-Inhibitors als Reaktion auf verschiedene Konzentrationen (d. h. 10 und 100 ng/ml) von Kathepsinen (L-, S- und B-Subtypen) wurden alle gemischt, die in phosphatgepufferter Lösung (PBS) bei 37 °C gegeben wurden. Bis zu fünf Tage lang wurden die Überstände jeden Tag für die UV-Absorptionsmessung gesammelt. Die Kathepsine wurden zu jedem Zeitpunkt von 0,125, 0,25, 0,5, 1 und 3 Tagen zugegeben.

Die menschliche Mikroglia-Zelllinie SV40 wurde von Applied Biological Material Inc. (T0251, Milton, Kanada) erworben und in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/ F-12 in 1:1) (#11320-033, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts) kultiviert,

Zellkultur für In-vitro-Experimente

Veröffentlicht in Zusammenarbeit mit dem Australischen Institut für Regenerative Medizin

24 Kulturplatte mit Kollagenlösung (50 µg/mL in 20 mM Essigsäure) beschichtet und vor der Kultur der SV40-Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Mausfibroblasten (NIH3T3) wurden von der American Type Culture Collection (NIH/3T3 - CRL-1658, Manassas, VA, USA) bezogen und in DMEM (#11995-065, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), ergänzt mit 10 % FBS und 1 % PS, kultiviert. Die Zellen wurden in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C inkubiert.

In-vitro-Zytotoxizitätstests mit Hydrogelen

Die In-vitro-Zytotoxizität des hergestellten Hydrogels wurde mit dem Cell Counting Kit-8-Assay (CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan) untersucht. NIH3T3-Zellen wurden in 24-Well-Platten ausgesät und mit den Hydrogelen in den 24-Transwell-Einsätzen kultiviert. Fibroblasten (NIH3T3) sind eine repräsentative Zellquelle zur Prüfung der Zytotoxizität von Biomaterialien, da diese Zellen hohe Wachstumsraten und biologische Reaktionen aufweisen.^{43,44} Außerdem wurde berichtet, dass aus Fibroblasten retinale Pigmentepithel-ähnliche Zellen und retinale Ganglienzellen gewonnen werden können.^{45,46} Daher haben wir unseren Zellzytotoxizitätstest des Hydrogels mit NIH3T3-Zellen durchgeführt. Nach der Inkubation mit den Hydrogelen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 1,5 Stunden bei 37 °C in DMEM-freies Medium mit 10 % CCK-8-Lösung getaucht. Der Überstand wurde aufgefangen und die Absorption von Licht bei 450 nm Wellenlänge mit einem Mikroplattenlesegerät gemessen. Die Färbung von lebenden und toten Zellen wurde mit einem Live & Dead/Cytotoxicity Assay Kit (#L3224, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Eine Mischung aus 4 mM Calcein AM (grün) und 2 mM Ethidium-Homodimer-1 (rot) wurde den Kulturmedien zugesetzt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) sichtbar gemacht.

In-vitro-Studie zur entzündungshemmenden Wirkung auf Mikroglia

SV40-Zellen wurden 1 Tag lang mit 50 ng/ml TNF-α (#210-TA, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) kultiviert, um eine

entzündliche Mikroglia. Zur Untersuchung der entzündungshemmenden Wirkung wurden entzündungsaktivierte Mikroglia mit drei verschiedenen Bedingungen behandelt: 1) nur Hydrogel (nur Gel), 2) nur EZH2-Inhibitor (nur Medikament) und 3) mit EZH2-Inhibitor beladenes Hydrogel (Medikament & Gel).

Test der Kathepsin-Aktivität

Zur Bestätigung der von nicht aktivierten und aktivierten Mikroglia sezernierten Kathepsine wurde das konditionierte Medium nach einem Tag der Inkubation der Mikroglia in DMEM/F-12-Medien geerntet. Das Gewebe der rd10-Modellnetzhaut wurde für die Untersuchung der Kathepsin-Aktivität *in vivo* verwendet. Zur Analyse der Aktivitäten von Cathepsin L, S und B wurden fluoreszenzbasierte Assay-Kits (#K142, #K144, #K140, Biovision, Milpitas, Kalifornien, USA) verwendet. Das Verfahren wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde mit einem Fluoreszenzplattenlesegerät bei 400/505 nm für die Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen gemessen.

Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time PCR) für mRNA-Tests

Die Genexpression von Cathepsinen (Cathepsin L, S und B) und Entzündungsmarkern (TNF- α , IL1 β , CCL2, CCL5, CD86 und CD68) wurde mittels Echtzeit-PCR analysiert. Wir isolierten mRNA aus Mikroglia- und Netzhautgewebe mit einem RNeasy Mini Kit (#74104, QIAGEN, Hilden, Nordrhein-Westfalen, Deutschland) und synthetisierten sie zu cDNA mit einem SuperScript IV VIL0 Master Mix (#11755050, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Das Niveau der Genexpression wurde mit einem SYBR Premix Ex Taq (#RR420A, Takara, Kusatsu, Japan) gemäß den Anweisungen des Herstellers bestimmt. Die Sequenzen aller in dieser Studie verwendeten Primer sind in Tabelle

1. Die exprimierten Genniveaus wurden auf GAPDH normalisiert, das als Hauskeeping-Gen diente, und die relativen Genniveaus wurden nach der Methode $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnet.

Immunofluoreszenz-Färbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung *in vivo* wurde das Netzhautgewebe 15 Minuten lang mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und zum Einfrieren in eine Verbindung mit optimaler Schnitttemperatur (OCT) eingebettet. Die in 7 μ m kryo-sezierten Gewebe wurden mit 1:250 verdünntem Anti-Iba1-Antikörper (#019-19741, Wako, Osaka, Japan), 1:200 verdünntem Anti-IL1 β -Antikörper (#sc-12742, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), 1:500 verdünnter Anti-TNF- α -Antikörper (#ab183218, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK), 1:100 verdünnter Anti-CD68-Antikörper (#MCA1957T, Bio-Rad, Hercules, Contra Costa County, CA, USA), 1:500 verdünnter Anti-Cone arrestin-Antikörper (#AB15282, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), 1:100 verdünnter Anti-Cathepsin L Antikörper (#ab133641, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK), 1:300 verdünnter Anti-Cathepsin S Antikörper (#sc-271619, Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) und 1:250 verdünnter Anti-Cathepsin B Antikörper (#ab214428, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK) als Primärantikörper. Bei den sekundären Antikörpern handelte es sich um 1:500 verdünnte Esel-Antikörper gegen Kaninchen-IgG (#A21207, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) und 1:500 verdünnte Ziegen-Antikörper gegen Maus-IgG (#A11001, Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA). Die Quantifizierung der entzündlichen Mikroglia und der Zapfenzellen wurde anhand von immunfluoreszenzgefärbten Netzhautkryoschnitten gemessen. Die entzündlichen Mikroglia wurden im gelben Bereich gezählt, der grün (Iba1) und rot (IL1 β oder CD68) im

Netzhautschnitt mit ImageJ überlappt. Die Zapfenzellen wurden im mit Zapfen-Arrestin-Antikörper gefärbten grünen Bereich mit ImageJ gezählt. Die gemessene Fläche wurde durch Berechnung der DAPI-Fläche (blau) der Netzhaut normalisiert. Die Dicke der Photorezeptorschicht wurde aus zufällig ausgewählten Bereichen in drei Netzhäuten gemittelt, um die genaue Wirkung der mit EZH2-Inhibitoren beladenen Hydrogele zu bestimmen.

Western Blot

Für das Immunoblotting wurden die vorbereiteten Zellproben mit RIPA-Lysepuffer (#R0278, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) einschließlich Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (#ab201119, Abcam, Cambridge, Cambridgeshire, UK) lysiert. Gleiche Proteinmengen wurden auf ein 4-15%iges Gradientengel (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) geladen und auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF) (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) übertragen. Anschließend wurden die Membranen mit 5% BSA in TBST (TBS mit 0,1% Tween 20) für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Membranen wurden mit primären Antikörpern inkubiert, darunter 1:5000 verdünnter Anti-GAPDH-Antikörper (#ab8245, Abcam, Cambridgeshire, UK), 1:1000 verdünnter Anti-Phospho-STAT (#9167, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 1:1000 verdünnter anti-STAT1-Antikörper (#9172, Cell Signaling) und 1:1000 verdünnter anti-IRF1-Antikörper (#8478, Cell Signaling) in 5% BSA in TBST bei 4°C über Nacht. Die Membranen wurden mit 1:1000 verdünntem HRP-konjugiertem Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen-IgG (#7074, #7076, Cell Signaling) bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Die Immunoblots wurden mit dem Chmilumineszenzsystem (#34095, Thermo-Fisher, Waltham, Massachusetts, USA) visualisiert, und die Bilder wurden mit einem iBright CL1500 Imaging-System (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA) aufgenommen. Die unbearbeiteten Bilder des Immunoblottings sind in der ergänzenden Abb. 6 dargestellt.

Vorbereitung der Tiere

Die Tierstudie wurde vom Korea Institute of Science and Technology (KIST-5088-2022-05-077) genehmigt. Alle Tierversuche wurden gemäß den institutionellen Richtlinien für die Pflege und Verwendung von Labortieren durchgeführt. Wildtyp-Mäuse (Stamm C57BL/6J) wurden von Daehan BioLink (Eumseong, Südkorea) erworben. Mäuse mit Netzhautdegeneration 10 (*rd10*) wurden als Retinitis-Pigmentosa-Modell (RP) verwendet. Wir erwarben Zuchtpaare von *rd10*-Mäusen (B6.CXB1-*Pde6b*^{rd10}/J) vom Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME), und eine Kolonie wurde in der KIST-Tieranlage gehalten. Die *rd10*-Maus ist das am häufigsten verwendete Tiermodell zur Untersuchung des Modells der autosomal rezessiven RP⁴⁷. Die Degeneration der Photorezeptoren bei *rd10*-Mäusen ist dafür bekannt, dass sie das typische Muster der menschlichen RP gut nachahmt, da sie sich nicht mit der Netzhautentwicklung überschneidet und die Aufzeichnung von Lichtreaktionen für etwa einen Monat nach der Geburt ermöglicht⁴⁸. Die *rd10*-Mäuse können jedoch nur einen RP-Genotyp repräsentieren, der eine Missense-Mutation im *Pde6b*-Gen (Phosphodiesterase 6B, cGMP, Stäbchenrezeptor, Beta-Polypeptid) trägt⁴⁷. Daher werden zur Abdeckung verschiedener RP-Genotypen wie *Crb1*⁴⁹ abdecken zu können, werden weitere *rd*-Mäuse benötigt.

Intravitreale Injektion in vivo und Präparation von

Netzhautgewebe Um die entzündungshemmende Wirksamkeit der Materialien zu vergleichen, haben wir 4 verschiedene Mausgruppen vorbereitet: 1) *rd10*-Kontrolle ohne jegliche Injektion, 2) nur Hydrogel (nur Gel), 3) nur EZH2-Inhibitor (nur Medikament) und 4) EZH2-Inhibitor-beladenes Hydrogel (Medikament & Gel). Während der intravitrealen Injektion wurden die Mäuse mit Isofluran und Sauerstoff narkotisiert. Zur Injektion der vorbereiteten Materialien wurde ein kleines Loch mit einer 30 G 1/2 Nadel etwas hinter dem Limbus punktiert. Anschließend wurde das vorbereitete Hydrogel und der EZH2-

Inhibitor (Tazemetostat) in einer Menge von 1-2 µl mit einer 33 G Hamilton-Nadel (#NANOFIL, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) intravital in 5 Wochen alte Mäuse injiziert. 2 Wochen nach der Injektion wurden die Mäuse durch Inhalation von verdampfendem Isofluran betäubt und durch zervikale Dislokation geopfert. Anschließend wurde das Netzhautgewebe mit einer feinen Pinzette vom Augapfel getrennt und für In-vivo-Experimente verwendet.

Patch-Clamp-Aufzeichnung und Lichtstimuli

Die physiologischen Funktionen des Netzhautgewebes wurden auf der Ebene einzelner Spikes in jedem einzelnen RGC mit Hilfe von Patch-Clamp-Aufzeichnungen untersucht. Die abgetrennten Netzhäute wurden mit der Ganglienzellseite nach oben auf ein Filterpapier montiert, das in der Mitte ein kleines Loch (~2 mm Durchmesser) hatte, um Lichtreize zu ermöglichen. Die präparierten Proben wurden auf einem Objektträger platziert und konstant mit 4 ml/min mit sauerstoffhaltigem Ames-Medium (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) perfundiert, das bei 34-36 °C gehalten wurde. Die Spiking-Aktivitäten der RGCs wurden mit einer Glaspipette (8-11 MΩ) unter Verwendung der zellgebundenen Patch-Clamp-Methode aufgezeichnet. Nach Entfernung der inneren Grenzmembran wurden Alpha-RGCs mit großen Somata (>20 μm) gezielt^{50,51}. Als Masseelektroden wurden zwei mit Silberchlorid beschichtete Silberdrähte in Form von Kugeln an den gegenüberliegenden Seiten einer Aufzeichnungskammer angebracht. Die Daten wurden aufgezeichnet und mit Hilfe eines Verstärkers (MultiClamp 700B, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) bei 2 kHz tiefpassgefiltert.

Bei den Lichtreizen wurden stationäre, 1 Sekunde lange weiße Lichtblitze auf grauem Hintergrund auf die Photorezeptorschicht fokussiert und wurden in verschiedenen Durchmessern von 100 bis 1000 μm verabreicht. Alle visuellen Stimuli wurden 5-7 Mal wiederholt. Die Anzahl der aufgezeichneten RGCs betrug 16, 21, 20 und 27 in den Gruppen "Kontrolle", "Nur Gel", "Nur Medikament" bzw. "Medikament und Gel".

Analyse der durch Licht ausgelösten Spike-Reaktionen

Mit Hilfe von Patch-Clamp-Aufzeichnungen konnten wir anspruchsvolle Analysen auf Spike-Ebene von vor Degeneration geschützten retinalen Neuronen durchführen. Zunächst wurde das Timing der ausgelösten Spikes aus den Rohaufzeichnungen durch benutzerdefinierte Skripte, die in MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA) geschrieben wurden, ermittelt. Auf der Grundlage der durch Licht hervorgerufenen Reaktionen wurden die RGCs in die Subtypen ON, OFF, ON-OFF und unknown (enthalten keine Antwortzelle oder verbleibende Zelle außer der klassifizierten Zelle) eingeteilt. RGCs wurden nicht mit bewegten Reizen auf richtungsselektive Subtypen getestet.⁵²⁻⁵⁴ Die Spikes der eingeschalteten und ausgeschalteten RGCs wurden für die Dauer der Präsentation des Lichtreizes von 1 bis Sekunden (siehe rotes Band in Abb. 7a) bzw. für 1 Sekunde ab dem Offset des Lichts (siehe blaues Band in Abb. 7a) gezählt. Im Falle der unbekannteren RGCs und der ON-OFF-RGCs war es jedoch schwierig, die Polarität der Reaktion (d. h. ON oder OFF) zu bestimmen. Daher haben wir die Anzahl der Spikes aus den beiden ON- und OFF-Reaktionsperioden gemittelt (für 2 s; rote und blaue Bänder in Abb. 7a). Aus der Anzahl der Spikes, die sich aus den verschiedenen Spotgrößen (d. h. von 100 bis 1000 μm) ergaben, wählten wir die größte Anzahl von Spikes für die folgenden Analysen aus. Die Feuerungsraten wurden mit einer Bin-Größe von 20 ms berechnet, die in 5 ms-Schritten verschoben wurde; die Spitzenfeuerungsrate (PFR) war der Maximalwert dieser berechneten Feuerungsraten. Außerdem untersuchten wir die Konsistenz des Spike-Timings, indem wir den Spike time tiling coefficient (STTC) über Wiederholungen hinweg berechneten⁵⁵ unter Verwendung der folgenden Gleichung (1): $STTC = 1/2 \times [(P_A - T_B)/(1 - P T_{AB}) + (P_B - T_A)/(1 - P T_{BA})]$. P_A ist der Anteil der Spikes von A, die innerhalb ±Zeitfenster (±Δt) eines beliebigen Spikes von B (P_B ähnlich berechnet), T_A ist der Anteil der gesamten Aufzeichnungszeit, der innerhalb ±Δt eines beliebigen Spikes von A liegt (T_B ähnlich berechnet). Wir haben in dieser Arbeit Δt von 10 ms verwendet.

Die berechneten STTCs wurden als farbkodierte Wärmematrizen dargestellt (Abb. 8b). Jede Wärmematrix der für eine bestimmte Zelle berechneten STTCs ist mit dünnen

Farbrändern umgeben, die verschiedene Gruppen anzeigen (d. h. schwarz, blau, rot und grün für Kontrolle, nur Gel, nur Medikament und Medikament & Gel). Wir haben schwarze Farbe verwendet, um den Fall darzustellen, in dem der STTC-Wert aufgrund fehlender Spiking-Aktivität nicht definiert wurde. Die Wärmematrizen wurden in der folgenden Reihenfolge angeordnet: 1) niedrige bis hohe Anzahl von definierten STTC-Werten und 2) niedriger bis hoher durchschnittlicher STTC-Wert. Wir wählten 5 RGCs in der Mitte der angeordneten Wärmematrizen (siehe dicke weiße Ränder um sie herum) und ihre Rasterplots wurden als repräsentative Zellen dargestellt (Abb. 8a). Der Prozentsatz der "undefinierten" und "definierten" STTC-Werte in jeder Gruppe wurde berechnet (Abb. 8c). Die definierten STTC-Werte waren

auch als Datenpunkte in Violinplots dargestellt (Abb. 8d). Spontane Aktivitäten wurden durch Berechnung der Prä-Stimulus-Periode von 500 ms bewertet (Abb. 7d).

Statistische Analyse

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die in den Abbildungen 1, 4, 5 und 6 gezeigten Daten wurden anhand einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Tukey's Post-Hoc-Test in Prism analysiert. Die Daten in den Abbildungen 7 und 8 wurden mit einer einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Holm-Sidak-Post-Hoc-Test in Origin analysiert. Die statistische Signifikanz wurde mit $*p < 0,05$ angegeben, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$ und $****p < 0,0001$.

Zusammenfassung der Berichte

Weitere Informationen zum Forschungsdesign finden Sie in der Nature Research Reporting Summary, die mit diesem Artikel verlinkt ist.

DATENVERFÜGBARKEIT

Alle im Rahmen dieser Studie erzeugten oder analysierten Daten sind in diesem veröffentlichten Artikel und seinen ergänzenden Informationsdateien enthalten. Die in der aktuellen Studie verwendeten und/oder analysierten Datensätze sind auf Anfrage beim entsprechenden Autor erhältlich.

CODE-VERFÜGBARKEIT

Der zugrundeliegende Code, einschließlich der MATLAB-Codes, die zur Analyse der Spiking-Aktivitäten von Ganglienzellen verwendet wurden, ist nicht öffentlich zugänglich, kann aber qualifizierten Forschern auf begründete Anfrage vom entsprechenden Autor zur Verfügung gestellt werden.

Eingegangen: 22 April 2023; Angenommen: 30. November 2023;
Published online: 14 December 2023

REFERENZEN

- Bhardwaj, A., Yadav, A., Yadav, M. & Tanwar, M. Genetic dissection of non-syndromic retinitis pigmentosa. *Indian J. Ophthalmol.* 70, 2355-2385 (2022).
- Murakami, Y. et al. Nekrotisches Absterben von Zapfen-Photorezeptorzellen bei Retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis.* 6, e2038 (2015).
- Whitcup, S. M., Nussenblatt, R. B., Lightman, S. L. & Hollander, D. A. Inflammation in retinal disease. *Int. J. Inflam.* 2013, 724648 (2013).
- Zhao, L. et al. Mikrogliale Phagozytose lebender Photorezeptoren trägt zur erblichen Netzhautdegeneration bei. *EMBO Mol. Med.* 7, 1179-1197 (2015).
- Punzo, C., Xiong, W. & Cepko, C. L. Verlust des Tageslichtsehens bei Netzhautdegeneration: sind oxidativer Stress und Stoffwechselstörungen dafür verantwortlich? *J. Biol. Chem.* 287, 1642-1648 (2012).
- Sancho-Pelluz, J. et al. Mechanismen des Photorezeptor-Zelltods bei vererbter Netzhautdegeneration. *Mol. Neurobiol.* 38, 253-269 (2008).
- Zhao, L. et al. Photoreceptor protection via blockade of BET epigenetic readers in a murine model of inherited retinal degeneration. *J. Neuroinflammation* 14, 14 (2017).
- Mbefo, M. et al. Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) trägt zum Absterben von Stäbchenrezeptoren bei verschiedenen Formen der Netzhautdegeneration bei, und seine Aktivität kann als Biomarker für die Wirksamkeit von Therapien dienen. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9331 (2021).
- Arifuzzaman, S. et al. Selektive Hemmung von EZH2 durch einen niedermolekularen Inhibitor reguliert die für Entzündungen wichtige mikrogliale Genexpression. *Biochem. Pharmacol.* 137, 61-80 (2017).
- Cooper, R. C. & Yang, H. Hydrogel-based ocular drug delivery systems: emerging fabrication strategies; applications; and bench-to-bedside manufacturing considerations. *J. Control. Rel.* 306, 29-39 (2019).
- Wang, K. & Han, Z. Injizierbare Hydrogele für ophthalmische Anwendungen. *J. Control. Rel.* 268, 212-224 (2017).
- Zhang, X., Wei, D., Xu, Y. & Zhu, Q. Hyaluronsäure in der okulären Medikamentenverabreichung. *Kohlenhydr. Polym.* 264, 118006 (2021).
- Khunmanee, S., Jeong, Y. & Park, H. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J. Tissue Eng.* 8, 2041731417726464 (2017).
- Han, S. S. et al. In situ vernetzbare Hyaluronsäure-Hydrogele mit kupferfreier Klick-Chemie für Knorpelgewebe-Engineering. *Polym. Chem.* 9, 20 (2018).
- Fu, S., Dong, H., Deng, X., Zhuo, R. & Zhong, Z. Injectable hyaluronic acid/poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked via strain-promoted azide-alkyne cycloaddition click reaction. *Carbohydr. Polym.* 169, 332-340 (2017).

16. Lin, T., Lu, Y., Zhang, X., Gong, L. & Wei, C. Treatment of dry eye by intracanalicular injection of a thermosensitive chitosan-based hydrogel: evaluation of biosafety and availability. *Biomater. Sci.* 6, 3160-3169 (2018).
17. Chen, L. et al. Injizierbares bio-responsives Hydrogel zur Therapie von entzündungsbedingten Augenliderkrankungen. *Bioact. Mater.* 6, 3062-3073 (2021).
18. Wang, S. et al. A novel stimuli-responsive injectable antibacterial hydrogel to achieve synergetic photothermal/gene-targeted therapy toward uveal melanoma. *Adv. Sci.* 8, e2004721 (2021).
19. Kumar, Vr, S. & Anders, H. J. Cathepsine sind potenzielle therapeutische Ziele in der Niere Krankheit. *Kidney Int.* 90, 933-935 (2016).
20. Creasy, B. M. & McCoy, K. L. Cytokine regulieren Cystein-Cathepsine während TLR-Reaktionen. *Cell. Immunol.* 267, 56-66 (2011).
21. Reiser, J., Adair, B. & Reinheckel, T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* 120, 3421-3431 (2010).
22. Vidak, E., Javoršek, U., Vizovišek, M. & Turk, B. Cysteine cathepsins and their extracellular roles: shaping the microenvironment. *Cells* 8, 264 (2019).
23. Kim, H. et al. On-demand local immunomodulation via epigenetic control of macrophages using an inflammation-responsive hydrogel for accelerated wound healing. *ACS Appl. Mater. Inter.* 14, 4931-4945 (2022).
24. Dai, X. et al. Effects of subretinal gene transfer at different time points in a mouse model of retinal degeneration. *PLoS One* 11, e0156542 (2016).
25. Rösch, S., Johnen, S., Müller, F., Pfarrer, C. & Walter, P. Correlations between ERG; OCT; and anatomical findings in the rd10 mouse. *J. Ophthalmol.* 2014, 874751 (2014).
26. Chang, B. et al. Zwei Netzhautdegenerationen bei Mäusen, verursacht durch Fehlmutationen in der Beta-Untereinheit des cGMP-Phosphodiesterase-Gens der Stäbchen. *Vis. Res.* 47, 624-633 (2007).
27. Lu, Y., Aimetti, A. A., Langer, R. & Gu, Z. Bioresponsive Materialien. *Nat. Rev. Mater.* 2, 16075 (2017).
28. Barker, K. et al. Biologisch abbaubare DNA-aktivierte Poly(ethylenglykol)-Hydrogele, hergestellt durch kupferfreie Click-Chemie. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 27, 22-39 (2016).
29. Barnstable, C. J. Epigenetik und degenerative Netzhauterkrankungen: Perspektiven für neue therapeutische Ansätze. *Asia Pac. J. Ophthalmol.* 11, 328-334 (2022).
30. Rao, R. C., Hennig, A. K., Malik, M. T., Chen, D. F. & Chen, S. Epigenetic regulation of retinal development and disease. *J. Ocul. Biol. Dis. Info.* 4, 121-136 (2011).
31. Isa, I. L. et al. Hyaluronic acid based hydrogels attenuate inflammatory receptors and neurotrophins in interleukin-1 β induced inflammation model of nucleus pulposus cells. *Biomacromol* 16, 1714-1725 (2015).
32. Cyphert, J. M., Trempus, C. S. & Garantzotis, S. Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell biology. *Int. J. Cell Biol.* 2015, 563818 (2015).
33. Spiteri, A. G., Wishart, C. L., Pamphlett, R., Locatelli, G. & King, N. J. C. Microglia and monocytes in inflammatory CNS disease: integrating phenotype and function. *Acta Neuropathol.* 143, 179-224 (2022).
34. Goo, Y. S. et al. Spontaner oszillatorischer Rhythmus der Netzhautaktivitäten von zwei Mäusen mit Netzhautdegeneration (rd1 und rd10). *Korean J. Physiol. Pharmacol.* 15, 415-422 (2011).
35. Biswas, S. et al. Pharmacological analysis of intrinsic neuronal oscillations in rd10 retina. *PLoS One* 9, e99075 (2014).
36. Yoon, Y. J. et al. Retinal degeneration reduces consistency of network-mediated responses arising in ganglion cells to electric stimulation. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 28, 1921-1930 (2020).
37. Pardue, M. T. et al. Neuroprotektive Wirkung von subretinalen Implantaten bei der RCS-Ratte. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 674-682 (2005).
38. Ni, Y. Q., Gan, D. K., Xu, H. D., Xu, G. Z. & Da, C. D. Neuroprotektive Wirkung der transkornealen elektrischen Stimulation auf die lichtinduzierte Photorezeptorendeneration. *Exp. Neurol.* 219, 439-452 (2009).
39. Miyata, M. et al. Langfristige Wirksamkeit und Sicherheit der Anti-VEGF-Therapie bei Retinitis pigmentosa: ein Fallbericht. *BMC Ophthalmol.* 18, 248 (2018).
40. Jo, D. H. et al. CRISPR-Cas9-mediated therapeutic editing of Rpe65 ameliorates the disease phenotypes in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Sci. Adv.* 5, eaax1210 (2009).
41. Burnight, E. R. et al. CRISPR-Cas9 genome engineering: treating inherited retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye. Res.* 65, 28-49 (2018).
42. Im, M. & Fried, S. I. Indirect activation elicits strong correlations between light and electrical responses in ON but not OFF retinal ganglion cells. *J. Physiol.* 593, 3577-3596 (2015).
43. Pramanik, F., Satari, M. H. & Azhari, A. Zytotoxische Aktivität von Gambierblatt (uncaria gambir) Ethylacetat-Extrakt auf embryonale Maus-Fibroblastenzellen (NIH-3T3) mit MTT Assay. *Open. Dent. J.* 17, e187421062212300 (2023).
44. Leng, J. et al. Enzymatisch abbaubare Hydrogel-Beschichtungen auf Titan zur Hemmung von Bakterieninfektionen und zur Verbesserung der

45. Zhang, K. et al. Direkte Umwandlung menschlicher Fibroblasten in retinale pigmentepithelähnliche Zellen durch bestimmte Faktoren. *Protein Cell*. 5, 48-58 (2014).
46. Meng, F., Wang, X., Gu, P., Wang, Z. & Guo, W. Induction of retinal ganglion-like cells from fibroblasts by adenoviral gene delivery. *Neuroscience* 250, 381-393 (2013).
47. Chang, B. et al. Netzhautdegenerationsmutanten bei der Maus. *Vis. Res.* 42, 517-525 (2002).
48. Gargini, C., Terzibasi, E., Mazzoni, F. & Strettoi, E. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J. Comp. Neurol.* 500, 222-238 (2007).
49. Roh, H., Otgondemberel, Y., Eom, J., Kim, D. & Im, M. Electrically-evoked responses for retinal prostheses are differentially altered depending on ganglion cell types in outer retinal neurodegeneration caused by Crb1 gene mutation. *Front. Cell. Neurosci.* 17, 1115703 (2023).
50. Pang, J. J., Gao, F. & Wu, S. M. Light-evoked excitatory and inhibitory synaptic inputs to ON and OFF alpha ganglion cells in the mouse retina. *J. Neurosci.* 23, 6063-6073 (2003).
51. Murphy, G. J. & Rieke, F. Network variability limits stimulus-evoked spike timing precision in retinal ganglion cells. *Neuron* 52, 511-524 (2006).
52. Fried, S. I., Münch, T. A. & Werblin, F. S. Mechanisms and circuitry underlying directional selectivity in the retina. *Nature* 420, 411-414 (2002).
53. Im, M. & Fried, S. I. Directionally selective retinal ganglion cells suppress luminance responses during natural viewing. *Sci. Rep.* 6, 35708 (2016).
54. Otgondemberel, Y., Roh, H., Fried, S. I. & Im, M. Spiking characteristics of network-mediated responses arising in direction-selective ganglion cells of rabbit and mouse retinas to electric stimulation for retinal prostheses. *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 29, 2445-2455 (2021).
55. Cutts, C. S. & Eglén, S. J. Detecting pairwise correlations in spike trains: an objective comparison of methods and application to the study of retinal waves. *J. Neurosci.* 34, 14288-14303 (2014).

Hinweis des Herausgebers Springer Nature bleibt neutral in Bezug auf Rechtsansprüche in veröffentlichten Karten und institutionelle Zugehörigkeiten.

DANKSAGUNGEN

Diese Arbeit wurde zum Teil vom KIST Institutional Program (2E32551 für S.J.O. und M.I.) unterstützt. Diese Arbeit wurde auch teilweise durch NRF (National Research Foundation) von Korea Zuschüsse des Ministeriums für Wissenschaft und IKT (RS-2023-00208795 zu S.J.O., und 2020R1C1C1006065, 2021M3F3A2A01037366, und 2022M3E5E8017395 zu M.I.) unterstützt.

Außerdem wurde diese Arbeit durch einen Zuschuss des Korea Health Technology R&D Project über das Korea Health Industry Development Institute (KHIDI) unterstützt, das vom Ministerium für Gesundheit und Wohlfahrt der Republik Korea finanziert wird (HI22C1394 an K.L.). Schließlich wurde diese Arbeit teilweise durch ein von der koreanischen Regierung finanziertes NRF-Stipendium unterstützt (2017-Global Ph.D. Fellowship Program für H.K.). Die Autoren danken Seong-Woo Kim vom Department of Ophthalmology, Korea University College of Medicine, für seinen großzügigen Beitrag zur Messung des Augeninnendrucks und die hilfreiche Diskussion über unsere experimentellen Ergebnisse.

AUTORENBEITRÄGE

H.K. hat diese Studie konzipiert und die gesamten Experimente geplant und durchgeführt. H.R. führte die Patch-Clamp-Experimente an den Zellen durch und analysierte die Daten. Außerdem entwarfen H.K. und H.R. die Abbildungen und das Manuskript. S.H.K. beriet bei den biologischen Analysen. K.L., M.I. und S.J.O. überwachten alle Experimente und Datenanalysen und überarbeiteten Abbildungen und Manuskript. Das Manuskript wurde durch Beiträge aller Autoren verfasst. Alle Autoren haben der endgültigen Fassung des Manuskripts zugestimmt.

KONKURRIERENDE INTERESSEN

Die Autoren erklären, dass sie keine konkurrierenden Interessen haben.

ZUSÄTZLICHE INFORMATIONEN

Ergänzende Informationen Die Online-Version enthält zusätzliches Material, das unter <https://doi.org/10.1038/s41536-023-00342-y> verfügbar ist.

Korrespondenz und Materialanfragen sollten an Kangwon Lee, Maesoon Im oder Seung Ja Oh gerichtet werden.

Informationen zum Nachdruck und zur Genehmigung sind unter <http://www.nature.com/abrufbar>.



Open Access Dieser Artikel steht unter einer Creative Commons Attribution 4.0 International License, die die Nutzung, Weitergabe, Anpassung, Verbreitung und Vervielfältigung in jedem Medium oder Format erlaubt, solange Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle angemessen nennen, einen Link zur Creative Commons-Lizenz angeben und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die Bilder oder anderes Material von Dritten in diesem Artikel sind in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels enthalten, es sei denn, es wird in einer Kreditlinie zu dem Material anders angegeben. Wenn das Material nicht in der Creative-Commons-Lizenz des Artikels enthalten ist und die von Ihnen beabsichtigte Nutzung nicht durch gesetzliche Bestimmungen erlaubt ist oder über die erlaubte Nutzung hinausgeht, müssen Sie die Erlaubnis direkt beim Urheberrechtsinhaber einholen. Eine Kopie dieser Lizenz können Sie unter <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> einsehen.

© Der/die Autor(en) 2023