

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
des Klinikums rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. C.-P. Lohmann)

**Immunhistochemische Charakterisierung von  
Zellen aus dem Glaskörper-Raum in vitro – Identifizierung einer  
Glaskörpervorläuferzelle**

Peter Meint

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. C.-P. Lohmann
2. Priv.-Doz. Dr. A. Wegner

Die Dissertation wurde am 07.01.2013 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013  
angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1 Der Glaskörper.....	5
1.1.1 Anatomie.....	5
1.1.2 Biochemie.....	5
1.1.3 Physiologie.....	6
1.1.4 Pathophysiologie.....	6
1.2 Hyalozyten.....	7
1.2.1 Herkunft und Funktion.....	7
1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie.....	8
1.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	8
1.3.1 Anatomie des Ziliarkörpers.....	8
1.3.2 Funktion und Bedeutung.....	9
1.4 Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	11
1.4.1 Herkunft und Funktion.....	11
1.4.2 Physiologie und Pathophysiologie.....	11
1.5 Ziele der Arbeit.....	12
2. Material und Methodik.....	14
2.1 Material.....	14
2.1.1 Präparationsbedarf.....	14
2.1.2 Zellkulturbedarf.....	15
2.1.3 Immunmarkierungen.....	16
2.1.3.1 Allgemeine Materialien.....	16
2.1.3.2 Antikörper Anti-CD-68.....	16
2.1.3.3 Antikörper Anti-S-100.....	17
2.1.3.4 Antikörper Anti-S100-A2 .....	18
2.1.3.5 Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII.....	19
2.1.4 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen.....	19
2.1.5 Geräte.....	20
2.2 Methodik.....	21
2.2.1 Zellkulturen.....	21
2.2.1.1 Präparation der Hyalozyten.....	21
2.2.1.2 Präparation der Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	22
2.2.1.3 Präparation der Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	24
2.2.1.4 Allgemeine Kulturbedingungen.....	24
2.2.1.5 Passagieren.....	25
2.2.1.6 Einfrieren.....	26
2.2.1.7 Auftauen.....	27
2.2.2 Histologische Methoden.....	27
2.2.2.1 Herstellung der Paraffinschnitte.....	27
2.2.2.2 Herstellung der Präparate mit porkinem Glaskörper.....	28
2.2.3 Immunhistochemie.....	28
2.2.3.1 Immunmarkierungen mit Antikörpern.....	28
2.2.3.1.1 Vorbereitung der Immunmarkierungen.....	28
2.2.3.1.2 Durchführung der Immunmarkierungen.....	29
2.2.3.2 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen.....	31
2.2.3.2.1 Herstellung der Lösungen.....	31

2.2.3.2.2 Durchführung der Alcianblau-Färbungen.....	31
2.2.4 Versuchsdesign.....	32
2.2.4.1 Immunmarkierungen mit Antikörpern.....	32
2.2.4.1.1 Versuchsgruppe I: Immunmarkierungen mit den Antikörpern Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2.....	33
2.2.4.1.2 Versuchsgruppe II: Immunmarkierungen mit Antikörpern, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII.....	35
2.2.4.1.3 Beurteilung.....	36
2.2.4.2 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen.....	37
2.2.4.2.1 Versuchsaufbau.....	37
2.2.4.2.2 Beurteilung.....	38
2.2.5 Fotodokumentation.....	39
3. Ergebnisse.....	40
3.1 Zellkulturverlauf.....	40
3.1.1 Hyalozyten.....	40
3.1.1.1 Porkine Hyalozyten.....	40
3.1.1.2 Humane Hyalozyten.....	42
3.1.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	43
3.1.2.1 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	43
3.1.2.2 Humane Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	45
3.1.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels .....	46
3.2 Immunhistochemische Markierungen.....	50
3.2.1 Allgemeine Ergebnisse.....	50
3.2.1.1 Qualität der Präparate.....	50
3.2.1.2 Positivkontrollen.....	50
3.2.1.3 Negativkontrollen.....	51
3.2.2 Versuchsgruppe I: Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2.....	52
3.2.2.1 Hyalozyten .....	53
3.2.2.1.1 Porkine Hyalozyten.....	53
3.2.2.1.2 Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten.....	55
3.2.2.1.3 Humane Hyalozyten.....	56
3.2.2.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	58
3.2.2.2.1 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	58
3.2.2.2.2 Humane Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	60
3.2.2.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	61
3.2.2.3.1 Porkine Zellkulturen des Ziliarkörper-Epithels.....	61
3.2.2.3.2 Gewebsschnitte des porkinen Auges mit Ziliarkörper.....	64
3.2.2.3.3 Gewebsschnitte des humanen Auges mit Ziliarkörper.....	65
3.2.3 Versuchsgruppe II: Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII.....	67
3.2.3.1 Hyalozyten.....	68
3.2.3.1.1 Porkine Hyalozyten.....	68
3.2.3.1.2 Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten.....	69
3.2.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	71
3.2.3.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	72
3.2.3.3.1 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	72
3.2.3.3.2 Gewebsschnitte des porkinen Auges mit Ziliarkörper.....	74

3.3 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen.....	76
3.3.1 Porkine Hyalozyten.....	76
3.3.1.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	76
3.3.1.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	78
3.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	79
3.3.2.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	79
3.3.2.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	80
3.3.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	81
3.3.3.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	81
3.3.3.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.....	82
4. Diskussion.....	84
4.1 Zellkulturverlauf.....	84
4.1.1 Porkine und humane Hyalozyten.....	84
4.1.2 Porkine und humane Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	86
4.1.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	87
4.2 Immunhistochemische Markierungen.....	89
4.2.1 Versuchsgruppe I: Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2.....	89
4.2.1.1 Hyalozyten – porkine und humane Zellkulturen, porkiner Glaskörper.....	89
4.2.1.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels – porkine und humane Zellkulturen.....	92
4.2.1.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels – porkine Zellkulturen, porkine und humane Gewebsschnitte.....	95
4.2.1.4 Charakterisierung der Zellen durch kommerziell erhältliche Antikörper – Zusammenfassung Versuchsgruppe I.....	97
4.2.2 Versuchsgruppe II: Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII.....	99
4.2.2.1 Grundsätzliche Eigenschaften.....	99
4.2.2.2 Porkine Hyalozyten – Zellkulturen und Glaskörper.....	101
4.2.2.3 Porkine Zellkulturen des retinalen Pigmentepithels.....	102
4.2.2.4 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels – Zellkulturen und Gewebsschnitte.....	102
4.2.2.5 Testung zweier hyalozyten-spezifischer Antikörper – Zusammenfassung Versuchsgruppe II.....	104
4.3 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen.....	106
4.3.1 Porkine Hyalozyten.....	106
4.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels.....	108
4.3.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	109
4.3.4 Charakterisierung der Zellen anhand der extrazellulären Matrix – Zusammenfassung Alcianblau-Färbungen.....	111
5. Zusammenfassung.....	113
6. Verzeichnisse: Tabellen, Grafiken und Abbildungen.....	115
7. Literaturverzeichnis.....	121
8. Danksagung.....	128

## Abkürzungsverzeichnis

AEC.....	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AK.....	Antikörper
Ca.....	Calcium
CB.....	<i>ciliary body</i> , Ziliarkörper
CMZ.....	<i>ciliary margin zone</i> , ziliare Randzone
CO <sub>2</sub> .....	Kohlenstoffdioxid
CH <sub>3</sub> COOH.....	Essigsäure
CS.....	Chondroitinsulfat
D-MEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DS.....	Dermatansulfat
ECM.....	<i>extracellular matrix</i> , extrazelluläre Matrix
EDTA.....	<i>Ethylendiaminetetraacetic acid</i>
ERM.....	Epiretinale Membranen
EtOH.....	Ethanol
FBS.....	<i>fetal bovine serum</i> , fetales Kälberserum
GAG.....	Glykosaminoglykan(e)
GK.....	Glaskörper
HA.....	<i>hyaluronic acid</i> , Hyaluronsäure
HCl.....	Chlorwasserstoffsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
HRP.....	<i>horseradish peroxidase</i>
HS.....	Heparansulfat
MPS.....	Mukopolysaccharid(e)
NaCl.....	Natriumchlorid
NPE.....	Nicht pigmentiertes Epithel (des Ziliarkörpers)
P (1-3).....	Passage (1-3)
PBS.....	<i>phosphate buffer solution</i> , Phosphatpuffer
PE.....	Pigmentiertes Epithel (des Ziliarkörpers)
PFA.....	Paraformaldehyd
PK.....	Primärkultur
PVR.....	Proliferative Vitreoretinopathie
RNA.....	Ribonukleinsäure
RPE.....	Retinales Pigmentepithel
Tris.....	Trishydroxymethyl-Aminomethan

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Glaskörper

#### 1.1.1 Anatomie

Der Glaskörper (GK) füllt als gallertartige Substanz mit einem Volumen von 4 ml den Raum zwischen Linse, Ziliarkörper (*ciliary body* = CB) und Retina aus und ist somit Teil des optischen Apparates.

Durch seine Transparenz, Avaskularität und die zellfreien zentralen Anteile wird die ungehinderte Transmission des Lichtes zur Netzhaut gewährleistet. In seiner Form wird der GK durch eine transparente Grenzsicht (Membrana hyaloidea), die aus kondensierten peripheren Kollagenfibrillen besteht, stabilisiert. Er hat eine ringförmige Anheftung an der Papille (Martegiani-Ring) sowie Anheftungen an der Ora serrata (GK-Basis). Zusätzliche festere Adhärenzen bestehen im Bereich retinaler Blutgefäße, an allen anderen Stellen ist die Verbindung zwischen dem GK und der Netzhaut locker.<sup>7, 84</sup>

#### 1.1.2 Biochemie

Der GK besteht zu 98 Prozent aus Wasser. Das Wasser ist allerdings im GK nicht frei gelöst, sondern an Hyaluronsäure (*hyaluronic acid* = HA), ein Glycosaminoglykan (GAG), gebunden.<sup>7, 83</sup> Die HA, deren Produktion den Hyalozyten zugeschrieben wird, legt den Hydratisierungsgrad des GK fest und stabilisiert durch ihr hohes negatives elektrostatisches Potential das GK-Gerüst mechanisch.<sup>6, 46, 70, 84</sup>

Dieses GK-Gerüst ist aus einem Maschenwerk von Kollagenfibrillen und HA-Molekülen aufgebaut, stabilisiert durch Glycosaminoglykane, Proteoglykane und Fibronectin. Der Kollagenanteil besteht zu über 90 Prozent aus Typ II-Kollagen, aber auch Hybride der Typen V und XI, sowie Typ IX sind zu finden. Im adulten GK wird nach derzeitiger Kenntnis kein Kollagen II mehr nachgebildet. Der Kollagenanteil bestimmt die Struktur des GK-Gerüsts. Das Kollagengerüst verdichtet sich zur Peripherie hin und bildet am Rand den GK-Cortex, der in Verbindung zur Linse, zum CB und zu den Gliazellen der Retina steht. Eine weitere Strukturkomponente des GK ist Chondroitinsulfat, ebenfalls ein GAG. Daneben enthält der GK auch nichtkollagenöse Proteine wie Albumin, eisenbindende Proteine und Lipide, zu einem sehr geringen Anteil auch Glucose. Eigene Blutgefäße und Nerven besitzt der GK nicht.<sup>83, 96, 97</sup>

### 1.1.3 Physiologie

Aufgrund seiner Eigenschaften übernimmt der GK verschiedene Funktionen: als größtes Kompartiment im Auge füllt er die Mitte des Bulbus aus und stabilisiert diesen dadurch. Er stützt das umliegende Gewebe und kann es somit vor mechanischen Traumata schützen, vor allem die Retina wird durch den GK vor einer Ablösung geschützt. Als Teil des optischen Apparates leitet er das Licht durch das Auge auf die Netzhaut, wobei sein Brechungsindex dem des Kammerwassers (1,33) gleicht.<sup>85</sup>

### 1.1.4 Pathophysiologie

Viele Krankheitsbilder machen es erforderlich, den GK zu entfernen und durch synthetische GK-Ersatzstoffe zu substituieren. Zu den häufigsten Ursachen zählen die proliferative Vitreoretinopathie, die proliferative diabetische Vitreoretinopathie, Netzhautrisse, Glaskörperblutungen sowie die Endophthalmitis. Neben strukturellen und biochemischen, häufig altersbedingten Veränderungen, kommen auch posttraumatische oder postoperative Läsionen als Ursache für eine operative Entfernung des GK in Frage.<sup>29, 86, 87</sup>

Nach einem solchen Eingriff wird der Bulbus mit einem artifiziellen GK-Ersatzstoff gefüllt.

Dieser GK-Ersatzstoff muss zahlreichen Anforderungen gerecht werden:

er dient nicht nur der Volumensubstitution, sondern wird auch als intraoperatives Werkzeug und zur Netzhauttamponade benötigt.

Der GK-Ersatzstoff muss in seiner Form stabil bleiben, um den Bulbus langfristig zu stützen. Er sollte vom Auge nicht resorbiert werden und darf auf das umliegende Gewebe nicht toxisch einwirken.

Es ist erforderlich, dass der GK-Ersatzstoff mit geringem technischem Aufwand in das Auge appliziert werden kann und auch eine Entfernung muss zu jedem Zeitpunkt mit geringem Aufwand möglich sein.

Heutzutage dienen als GK-Ersatzstoffe üblicherweise Luft sowie andere Gase und Gasgemische, viskoelastische Substanzen, Perfluorchlorcarbone oder Silikonöl.<sup>29</sup>

Bei all diesen GK-Ersatzstoffen zeigen sich jedoch im klinischen Alltag die im Folgenden aufgeführten Nebenwirkungen, sodass keine dieser Substanzen den an sie gestellten Anforderungen bisher vollkommen gerecht werden konnte:

alle derzeit eingesetzten GK-Ersatzstoffe können ursächlich für die Entstehung des Katarakts beziehungsweise dessen Progression sein.<sup>28, 35, 60</sup>

Emulsifikationen des GK-Ersatzstoffes beeinträchtigen oft die Funktion des Trabekelwerks und führen so zum Glaukom. Dieses Phänomen zeigt sich bei der Ausbreitung von Gasen postoperativ und stellt vor allem auch bei Silikonölen eine sehr häufige Komplikation dar.<sup>2, 59, 60</sup>

In vielen Fällen kommt es nach der operativen Therapie zu einer Ablösung der Netzhaut. Dies hat zum Teil mechanische Ursachen, da die verschiedenen GK-Ersatzstoffe aufgrund des unterschiedlichen spezifischen Gewichts im Vergleich zu dem natürlichen GK nur begrenzte Tamponade-Eigenschaften besitzen und den Druck auf die Netzhaut nicht in allen Bereichen gleichermaßen gewährleisten können. Eine weitere häufige Ursache für die Netzhautablösung stellt die proliferative Vitreoretinopathie dar<sup>43</sup>. Die damit verbundene unkoordinierte Zellproliferation mit Ausbildung von Membranen kann sich auf, innerhalb oder unter der Retina zeigen und führt in diesen Fällen einige Wochen bis Monate postoperativ zur rhegmatogenen Retina-Ablösung.<sup>41, 73, 100</sup>

Auch zeigen sich schädigende Einflüsse der GK-Ersatzstoffe wie Silikonöl auf die Zellen des Cornea-Endothels, die in diesen Fällen als ursächlich für eine entstehende Keratopathie gesehen werden.<sup>9, 40</sup>

Außerdem ließen sich für die meisten GK-Ersatzstoffe signifikante Toxizitäten für die Retina sowie das Auge im Allgemeinen nachweisen.<sup>62, 80, 98</sup>

Da all diese Komplikationen medikamentös bis heute nur bedingt beeinflussbar und damit nicht adäquat zu therapieren sind<sup>4, 52, 95</sup>, machen sie die Entfernung der entsprechenden Substanz aus dem Auge notwendig.

Aufgrund der durch artifizielle GK-Ersatzstoffe verursachten Komplikationen und morphologischen und strukturellen Veränderungen am okulären Gewebe erscheint ein zellbasierter GK-Ersatz als vielversprechende Alternative.

## 1.2 Hyalozyten

### 1.2.1 Herkunft und Funktion

Hyalozyten werden als 'wandernde Phagozyten' beschrieben, die bei der embryonalen Entwicklung aus vorübergehend einsprossenden Gefäßen in den GK einwandern.<sup>63, 82</sup>

Die Hyalozyten sind frei liegende Zellen im Cortex-Bereich des GK. Ihre höchste Konzentration ist im Bereich der GK-Basis beziehungsweise der Papille zu finden. Unter physiologischen Bedingungen zeigen diese Zellen keinerlei mitotische Aktivität.<sup>8, 84</sup>

Jedoch wurde von Balazs et al. auch beim gesunden Auge ein kontinuierlicher Ersatz von



Hyalozyten über den Ziliarkörper beschrieben.<sup>8</sup>

Seit vielen Jahrzehnten werden Hyalozyten bei unterschiedlichen Spezies untersucht, um Näheres über deren Ursprung, spezifische Eigenschaften und potentielle Funktionen herauszufinden.

Der zelluläre Ursprung der Hyalozyten ist bis dato noch nicht vollständig geklärt, von den meisten Autoren werden die Hyalozyten aufgrund ihrer morphologischen, histochemischen und immun-histochemischen Eigenschaften als Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie gesehen.<sup>15, 39, 57, 79, 82, 99</sup>

### 1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie

Den Hyalozyten werden sekretorische Funktionen zugesprochen, eine Beteiligung an der Produktion von HA sowie Kollagen wird von vielen Autoren beschrieben.<sup>45, 46, 68, 83, 84, 90</sup>

Auch werden sekretorische Einflüsse der Hyalozyten auf Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) bei der Entstehung von epiretinalen Membranen (ERM) diskutiert.<sup>58</sup>

Im Gegensatz zur vermuteten Beteiligung der Hyalozyten bei pathophysiologischen Vorgängen im vitreoretinalen Raum<sup>43, 53, 71</sup> existieren derzeit weit weniger Erkenntnisse über deren grundsätzliche zelluläre Charakteristika und ursprüngliche physiologische Aufgaben.

Aufgrund der nachgewiesenen Produktion der Hyalozyten von extrazellulärer Matrix (*extracellular matrix* = ECM) wie HA in vivo und in vitro kann eine Beteiligung dieser Zellen an der Produktion der GK-Matrix vermutet werden.<sup>45, 46, 68, 83, 84, 90</sup>

So kommt den Hyalozyten eine wichtige Rolle als potentielle 'Glaskörpervorläuferzelle' zu. Über den genauen zellulären Ursprung der Hyalozyten gibt es jedoch bis heute keine exakten Erkenntnisse.

Nach wie vor existiert kein eindeutiger Marker zur Identifizierung von Hyalozyten in Gewebsschnitten und Zellkulturen.<sup>57, 63, 68, 79</sup> Auch morphologische Kriterien sind zur Detektion der Zellen nur bedingt geeignet, da die Zellen in verschiedenen Aktivitätszuständen phänotypischen Veränderungen unterliegen können.<sup>30 - 34, 57, 78, 99</sup>

## 1.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels

### 1.3.1 Anatomie des Ziliarkörpers

Der Ziliarkörper (CB) kann anatomisch als eine Verbreiterung der Uvea betrachtet werden, die zwischen Iris und ora serrata liegt. Sein Stroma verfügt über eine ausgeprägte Vaskularisierung und viel glatte Muskulatur. Auch lassen sich dort ansässige Melanozyten finden. Der CB in seiner

Gesamtheit lässt sich in 2 anatomische Substrukturen gliedern: der der Iris anliegende anteriore Anteil der pars plicata, welcher ca. 2-5 mm lange Ausläufer enthält, die jeweils Blutgefäße und Stroma in ihrem Inneren enthalten und als Ziliarprozesse bezeichnet werden, sowie der posteriore Anteil, die sogenannte pars plana. Ihr Stroma kann als Fortsetzung der Aderhaut betrachtet werden, sie stellt eine Verbindung von Retina und pars plicata dar. Der CB ist von 2 Zellschichten kuboidaler Zellen bedeckt. Die innere dem GK und Kammerwasser anliegende Schicht ist nicht pigmentiert, die dem Stroma aufsitzende äußere Zellschicht enthält zahlreiche Melanosomen und ist deutlich pigmentiert. Nicht pigmentiertes Epithel (NPE) und pigmentiertes Epithel (PE) sind zwischen 2 Basallaminae gelagert und an ihren apikalen Membranen miteinander verbunden. Charakteristisch für dieses einzigartig organisierte Epithel sind außerdem spezielle interzelluläre Verbindungen (GAP junctions, Zonulae occludentes und Desmosomen), die die Funktionen der Zellen gewährleisten.<sup>56, 75, 81</sup>

### 1.3.2 Funktion und Bedeutung

Die Zellen des Ziliarkörperepithels (CB-Epithel) sind neuroektodermalen beziehungsweise neuroepithelialen Ursprungs.<sup>20, 48, 65</sup>

Zu ihren Funktionen gehört die Produktion des Kammerwassers, damit tragen diese Zellen eine wichtige Funktion für den Metabolismus von Linse und Cornea sowie die Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks.<sup>81, 89</sup> Eine Beteiligung an der Produktion der Zonula-Fasern wird diskutiert.<sup>36</sup>

Über die genauen unterschiedlichen Funktionen von NPE und PE ist wenig bekannt, es wird von spezifischer Aufgabenverteilung der beiden Zelltypen bei biochemischen Vorgängen ausgegangen.<sup>88, 89</sup>

Grundsätzlich gestaltet es sich durch die Anordnung der Zellen als eng verbundene Doppelschicht schwierig, die genauen Funktionen separat zu untersuchen.<sup>27, 55</sup>

Bertazolli Filho et al. beschreiben in ihren Untersuchungen an Kaninchen-Augen für die Zellen des NPE die Produktion von makromolekulären Komponenten des GK.<sup>11</sup> Auch Rittig et al. vermuten durch ihre Untersuchungen an Primaten-Augen eine Beteiligung der NPE-Zellen an der Produktion der HA des GK.<sup>76</sup>

Die Zellen des CB-Epithels von Säugetieren stehen seit einigen Jahren im Fokus des Interesses, da dort Vorläufer- und Progenitor-Zellen für retinale Neuronen und Glia-Zellen gefunden wurden.<sup>1, 19, 38, 61, 94</sup>

Bisher war eine solche Region, die sogenannte ziliare Randzone (*ciliary margin zone* = CMZ), entsprechend des Gebietes zwischen Retina und retinalem Pigmentepithel (RPE) als Produktionsort

aller retinaler Neurone und somit lebenslange Quelle zur Regeneration der Retina nur bei Fischen, Amphibien und Vögeln bekannt.<sup>42</sup>

Besonders interessante Resultate liefert eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Ducournau et al.: die Arbeitsgruppe führte neben Immunmarkierungen mit Antikörpern in vitro zusätzlich endoskopische Untersuchungen in vivo an Augen von Patienten mit Retinaablösung und proliferativer Vitreoretinopathie durch. Hier ließ sich bei den erkrankten Augen eine intensive Proliferation der nicht pigmentierten Epithelschicht (NPE) des Ziliarkörpers (CB) im Bereich der pars plana zeigen. Die Untersuchungen zeigten bei diesen Zellen Hinweise für eine neuronale Differenzierung der Zellen bei fehlenden Markern für Glia-Zellen.<sup>23</sup>

In den letzten Jahren wurde bei verschiedenen Spezies die Fähigkeit der Zellen des CB-Epithels zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung in retinale Neuronen und Glia-Zellen in vitro aufgezeigt.<sup>1, 38, 61, 94</sup>

Eine Region vergleichbar zur CMZ als potentielle Quelle für Stammzellen bei Säugetieren wird von einigen Autoren im speziellen in der pars plana Region des CB vermutet.<sup>49, 61, 66, 67</sup>

Das Neuroektoderm, Ursprung der Zellen des CB-Epithels, ist multipotent. Während der Embryogenese beim Säugetier entwickelt sich aus dem 'optic cup' die zentrale Retina und die periphere Region, entsprechend der CMZ. Während die zentrale Retina zum integrierten Teil des zentralen Nervensystems wird, entstehen aus der CMZ zwei nicht-neurale Strukturen: das doppelschichtige CB-Epithel und die distale Iris.<sup>65, 74</sup>

Die Arbeitsgruppe von Moe et al. hat sich in ihrer Arbeit mit der Charakterisierung der Zusammensetzung der potentiellen Vorläuferzellen aus dem CB-Epithel in vitro beschäftigt. Im Vergleich mit Vorläuferzellen aus dem Gehirn fanden die Autoren eine geringere Menge an neuronalen Stammzellmarkern, die Zellen wurden als 'epithel-artig' beschrieben.<sup>65</sup>

Auch Kohno et al. beschreiben in ihrer Arbeit deutliche Unterschiede der Progenitor-Zellen aus dem CB-Epithel im Vergleich mit Stammzellen aus dem Gehirn.<sup>54</sup>

Somit scheint bei diesen potentiellen Progenitor-Zellen aus dem CB-Epithel eine Balance zwischen der Ausprägung der neuronalen und epithelialen Anteile zu bestehen.<sup>23, 65</sup>

Da die Zellen des CB-Epithels aus nicht neuronalem Epithel neuroepithelialen Ursprungs entstehen, müssen sowohl epitheliale als auch neuronale Eigenschaften aufgedeckt werden, um diese letztendlich als klinische Quelle zu nutzen.<sup>65</sup>

So könnten die Zellen des CB-Epithels neben ihrer vermuteten Rolle als neuronale beziehungsweise Glia-Vorläuferzelle noch weitere Eigenschaften als Progenitor- oder Stammzellen innehaben.

Nicht zuletzt wegen der Lage der NPE-Zellschicht nahe der GK-Basis, der Region mit einer sehr hohen Dichte an Hyalozyten<sup>84</sup>, verdienen diese Zellen eine nähere Betrachtung im Hinblick auf Gemeinsamkeiten mit Hyalozyten als potentielle 'Glaskörpervorläuferzellen'.

## 1.4 Zellen des retinalen Pigmentepithels

### 1.4.1 Herkunft und Funktion

Die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) sind neuroepithelialen beziehungsweise neuroektodermalen Ursprungs und bestehen aus einem Monolayer pigmentierter Zellen. Sie liegen an ihrer apikalen Seite der äußeren Schicht der Photorezeptoren an. Mit der basolateralen Seite liegen die RPE-Zellen der Bruch'schen Membran, Trennschicht zur fenestrierten Choriocapillaris, an. Die Zellen des RPE sind beteiligt am Vitamin-A-Zyklus, zu ihren Aufgaben gehört außerdem die Phagozytose von licht-geschädigten Zellen der Photorezeptoren, sowie die Beteiligung am Nährstofftransport zwischen Choriocapillaris und Neuroretina. Auch die Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der Photorezeptoren wird durch die RPE-Zellen gewährleistet.<sup>16, 25, 93</sup>

### 1.4.2 Physiologie und Pathophysiologie

Für die RPE-Zellen wurde die Produktion extrazellulärer Matrix (ECM) gezeigt.<sup>17, 18, 24, 91, 92</sup> Obwohl die Bedeutung dieser extrazellulären Komponenten noch nicht vollständig geklärt ist, scheint dies sowohl physiologisch für die Aufrechterhaltung einer physikalischen Barriere der Bruch'schen Membran und zur Vorbeugung einer subretinalen Neovaskularisation<sup>17, 108</sup> als auch pathophysiologisch bei proliferativen Vitreoretinopathien (PVR)<sup>17, 43, 53, 71</sup> eine entscheidende Bedeutung zu haben.

Die Zellen des RPE zeigen Eigenschaften von Zellen der Monozyten-Makrophagen-Linie wie Phagozytose<sup>93</sup> oder die Expression des Zellmarkers CD 68<sup>25</sup>.

Auch bei der Entstehung sogenannter epiretinaler Membranen (ERM) wird den RPE-Zellen eine entscheidende Rolle zugesprochen. Bei den ERM handelt es sich um Zellproliferationen, die in Kombination mit verschiedenen zugrunde liegenden Erkrankungen des Auges, wie zum Beispiel der PVR, oder ohne erkennbare auslösende Pathologie auftreten können. Sie bestehen aus Zellanhäufungen und verschiedenen Zusammensetzungen von ECM. Diese ERM sind eine häufige Ursache für die rhegmatogene Netzhautablösung. Die Zellen des RPE werden zum Teil für diese

Proliferationen verantwortlich gemacht und werden häufig als Vorläufer der an der Pathogenese beteiligten Fibroblasten beziehungsweise 'fibroblasten-artigen' Zellen beschrieben.<sup>41, 43, 71, 103</sup>

Man geht davon aus, dass an den ERM noch weitere metaplastische Zellen anderen Ursprungs beteiligt sind, wobei die genaue Identifizierung der entsprechenden Zelltypen schwierig bleibt.<sup>43, 71</sup>

Sowohl die Veränderung der Morphologie der beteiligten Zellen<sup>37, 41, 103</sup> als auch immunhistochemische Veränderungen<sup>25</sup> verhinderten häufig die eindeutige Identifikation der Zelltypen.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Wie unter 1.1.4 dargestellt sind die derzeit eingesetzten synthetischen GK-Ersatzstoffe mit teils erheblichen Nebenwirkungen und Komplikationen verbunden.

Eine vielversprechende Alternative nach operativer Entfernung des GK würde der Ersatz durch körpereigenes GK-Gewebe darstellen. Derzeit existiert jedoch keine Möglichkeit zu einer solchen regenerativen Therapie.

Denn in vivo kann keine Neubildung von GK-Matrix beobachtet werden, auch ist noch ungewiss, welche Zellen in welchem Umfang an der Produktion der GK-Matrix beteiligt sind:

eine wichtige Bedeutung der Hyalozyten bei der Produktion der GK-Matrix wird seit langem vermutet.<sup>45, 46, 68, 83, 84, 90</sup>

Besonderes Interesse in Bezug auf ihre Verbindung zum Glaskörper gilt auch den Zellen des nicht pigmentierten Ziliarkörperepithels (NPE-Zellen). Auch für diese Zellen wird eine Beteiligung an der Produktion von GK-Matrix diskutiert<sup>11, 76</sup>.

So verdienen diese Zellen eine nähere Betrachtung im Hinblick auf eventuelle Gemeinsamkeiten mit Hyalozyten als potentielle 'Glaskörpervorläuferzellen'.

Eine eindeutige Identifizierung dieser beiden Zelltypen in vitro ist bis heute schwierig.

Ziel dieser Arbeit ist es, Hyalozyten und Zellen des CB-Epithels durch immunhistochemische Markierungen mit Antikörpern sowie durch deren Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM) in vitro näher zu identifizieren und Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Zelltypen herauszuarbeiten.

Als Vergleichsgruppe dienen jeweils Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE).

Eine Methode zur Identifizierung eines Zelltyps ist die Markierung mit entsprechenden Antikörpern. Im Vergleich zu einer Genanalyse ist dies eine leicht durchzuführende und rasch reproduzierbare Methode.

Bisher wurden weder für Hyalozyten noch für Zellen des NPE spezifische Antikörper beschrieben.

Lazarus et al. untersuchten in ihrer Arbeit 'In situ characterization of the human hyalocytes' die Reaktivität von humanen Hyalozyten mit verschiedenen Antikörpern. Als Besonderheit wurde von dieser Arbeitsgruppe die Markierung der Hyalozyten mit Anti-S-100, einem typischen Antikörper für Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie bei fehlender Reaktivität mit Anti-CD-68, einem weiteren Marker für Zellen der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie, dargestellt.<sup>57</sup>

In unserer Arbeit sollen in Anlehnung an die Experimente von Lazarus et al. die Antikörper Anti-CD-68 sowie Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 an Hyalozyten, RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels in Gewebsschnitten und Zellkulturen getestet werden.

Wegen der leichteren Verfügbarkeit in großer Anzahl werden porkine Augen in ophthalmologischen Experimenten häufig verwendet. Das Schwein gilt als exzellentes 'Nicht-Primaten-Modell' zum Menschen, da die Morphologie der des humanen Auges ähnelt und anatomische Regionen klar definiert sind, womit genaue Resektionen möglich sind. Auch existieren deutliche genetische Ähnlichkeiten zwischen Mensch und Schwein.<sup>38</sup>

Der in unserer Arbeit geführte Vergleich zwischen humanem und porkinem Gewebe beziehungsweise den entsprechenden Zellen soll Aufschluss über die grundsätzliche Möglichkeit der Übertragbarkeit der Resultate zwischen den beiden Spezies liefern.

Außerdem werden zwei eigens für diese Arbeit durch Immunisierung von Versuchstieren mit porkinen Hyalozyten hergestellte polyklonale Antikörper an den porkinen Zellkulturen und Gewebsschnitten auf ihre Spezifität für Hyalozyten hin getestet.

Zusätzlich soll eine Identifizierung der Zellen in Kultur durch deren Produktion an ECM geprüft werden. Alcianblau-Farbstoffe mit verschiedenen pH-Wert-Einstellungen (pH 1,0 und pH 2,5) sollen durch die Unterscheidung vom Vorliegen von sulfatierten GAG in der ECM der Zellen das Auffinden von extrazellulärer HA ermöglichen. Dies würde eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Identifizierung der Zellen unabhängig von morphologischen Kriterien bieten.

In dieser Arbeit werden das Wachstumsverhalten der Zellen in den einzelnen Passagen und deren typische morphologische Besonderheiten herausgearbeitet und miteinander verglichen.

Vor allem über die für diese Versuche verwendeten Zellkulturen des CB-Epithels sollen weitere Erkenntnisse gewonnen werden. Es wird untersucht, inwieweit der Pigmentgehalt, das eindeutige Unterscheidungsmerkmal der beiden Zellschichten NPE und PE in Gewebsschnitten *in vitro*, auch in Zellkultur Gültigkeit hat. Die immunhistochemischen Markierungen und Färbungen werden auch auf die Möglichkeit zur Unterscheidung von NPE- und PE-Zellen hin überprüft.

Ziel unserer Untersuchungen ist es letztlich, Aufschlüsse über die Eignung der untersuchten Zelltypen zur Entwicklung einer regenerativen Therapie des GK zu erhalten.

## 2. Material und Methodik

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Präparationsbedarf

Im Folgenden werden die für die Präparation der Zellkulturen und Histologiepräparate notwendigen Materialien aufgelistet:

Schlachtfrische Schweinebulbi (post mortem Zeit 8-12h)

Augen von humanen Hornhaut-Spendern (post mortem Zeit 8-12h)

Enucleationsschere

Gezahnte Pinzette

Einmal-Skalpell, *Feather safety razor Company Limited (Osaka, Japan)*

Augenstäbchen pro ophta 66 x 5 mm, *Lohmann und Rauscher International GmbH und Co. KG (Neuwied)*

Petrischalen cellstar, *Greiner bio-one International AG (Kremsmünster, Österreich)*

Sterile Mullkompressen, *Noba Verbandmittel Danz GmbH und Co. KG (Wetter/Ruhr)*

Spritze 20 ml, *Becton Dickinson Deutschland GmbH (Heidelberg)*

Sterile Pasteur-Pipette 600 ml, *Schott-Duran GmbH (Wertheim)*

SuperFrost<sup>®</sup>Objektträger, *Menzel Gläser GmbH und Co. KG (Braunschweig)*

Collagenase Typ IA von *Clostridium histolyticum*, *Sigma-Aldrich Corporation (St.Louis, USA)*

### 2.1.2 Zellkulturbedarf

Im Folgenden werden die Materialien, die im Verlauf der Zellkulturen benötigt wurden, aufgeführt:

Zellkulturflasche T 25 und T 75, *Corning Incorporated (New York, USA)*

Glasplättchen, 15 mm Durchmesser, *Marienfeld Glasware (Lauda-Königshofen)*

Deckgläser, 24 x 50 mm, *Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe)*

12-well-Platten nunclon Delta surface, *nunc™ (New York, USA)*

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) + 4,5 g/l Glucose + L-Glutamin-Pyruvat, *Gibco® , invitrogen™ Corporation (Carlsbad, USA)*

Dimethylsulfoxid (DMSO), *Gibco® , invitrogen™*

Glycerin, *Gibco® , invitrogen™*

Fetales bovines Serum (FBS) (Chargennummer 10270-106), *Gibco® , invitrogen™*

Phenolfreies Medium, *Gibco® , invitrogen™*

Penicillin/Streptomycin, *PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)*

Phosphatpuffer (*phosphate buffer solution = PBS*) , steril, *Gibco® , invitrogen™*

Trypsin-EDTA (*Ethylendiaminetetraacetic acid*), *PAA Laboratories*

Neubauer Zählkammer

Trypanblau-Lösung, *Sigma-Aldrich Corporation*

Zentrifugationsröhrchen 15 und 50 ml, *Greiner bio-one GmbH*

Paraformaldehyd (PFA) reinst DAC, *Carl Roth GmbH*

Kryoröhrchen 1,5 ml System 100 TM, *Nalgene® Cryoware Brand Products (Rochester NY, USA)*

Pipetten, steril, 5, 10 und 25 ml, *Sarstedt AG und Co. (Nümbrecht)*

Pipetboy comfort, *IBS Integra Biosciences (Fernwald)*

Pipetten Eppendorf Reference 10, 100 und 1000 µl mit passenden Spitzen, *Eppendorf Deutschland GmbH (Wesseling-Berzdorf)*

Pasteurpipetten, sterilisiert, *Carl Roth GmbH*

Bechergläser, *Schott-Duran Produktions GmbH und Co. KG (Mainz)*



### 2.1.3 Immunmarkierungen

Im Folgenden werden die für die immunhistochemischen Markierungen verwendeten Antikörper und Materialien näher beschrieben:

#### 2.1.3.1 Allgemeine Materialien

Histokit für Immunmarkierungen, *Zymed<sup>®</sup> Laboratories Inc. (San Francisco, USA)*

Peroxidase-Block, 15 ml

biotinylierter Sekundär-Antikörper, 15 ml

Streptavidin HRP (*horseradish peroxidase*)-Konjugat, 15 ml

AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Substrat Chromogen, 15 ml

Antikörperverdünnerlösung, 50 ml

PBS Tabletten, *Sigma-Aldrich*

Proteinase K, *DakoCytomation AG (Baar, Schweiz)*

Mayer's Hämatoxylinlösung, 500 ml, *Sigma-Aldrich*

Aquatex wässriges Eindeckmittel, 50 ml, *Merck KGaA (Darmstadt)*

SuperFrost<sup>®</sup> Plus Objektträger, *Menzel Gläser (Braunschweig)*

Färbekammer Rotilabo<sup>®</sup>, *Carl Roth GmbH*

Cover-plates, *Zytomed GmbH (Berlin)*

Inkubationskammer, *Zytomed GmbH*

Glaskasten mit Färbegestell, *Carl Roth GmbH*

#### 2.1.3.2 Antikörper Anti-CD-68

*Monoklonaler Antikörper aus Mausserum*

*Vertrieb: Zymed<sup>®</sup> Laboratories*

*Klon: KP 1*

*Isotyp: IgG1/kappa*

*Immunogen:* humane Alveolarmakrophagen

*Epitop:* nicht näher bestimmt

*Molekulargewicht:* 110 kDa

*Positivkontrolle:* Tonsille

*Markierung:* zytoplasmatisch

*Hintergrund:* Der Antikörper Anti-CD-68 ist ein typischer Marker für die Identifizierung von Makrophagen und Monozyten in verschiedenen Geweben. Eine Markierung mit diesem Antikörper kann somit bei der Aufklärung des Ursprungs eines bestimmten Zelltyps helfen. So weisen zum Beispiel myeloide Vorläuferzellen, Granulozyten und bestimmte T-Zellen – allesamt Zellen, bei denen eine Zugehörigkeit zur Makrophagen-Zelllinie angenommen wird – Markierungen mit Antikörpern gegen CD 68 auf.

### 2.1.3.3 Antikörper Anti-S-100

*Polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum*

*Vertrieb:* Zymed® Laboratories

*Klon:* Zy 44

*Isotyp:* IgG1

*Immunogen:* S 100 von Kuhprotein

*Epitop:* nicht näher bestimmt

*Molekulargewicht:* 21-24 kDa

*Positivkontrolle:* Melanom, Schwannom, humane Tonsillen

*Markierung:* zytoplasmatisch

*Hintergrund:* Der Antikörper Anti-S-100 markiert intrazelluläre Calcium bindende Proteine der S 100-Familie. Diese Proteine sind gesichert an der Regulation des Zellwachstums beteiligt. Es werden aber auch andere Funktionen, wie Veränderungen der Membranpermeabilität, Stimulation der RNA-Polymerase und Interaktionen mit Tumor-Suppressor-Proteinen vermutet. Am Aufbau der meisten der nunmehr 10 bekannten S 100-

Proteine sind sogenannte alpha- und beta-Ketten in unterschiedlichen Verhältnissen beteiligt. Beim Aufbau der S 100-Proteine sind teils beide, teils nur eine der beiden Ketten beteiligt. Auch existieren Subtypen, deren aufbauende Bestandteile den Ketten lediglich strukturell sehr ähnlich sind. Der in den Versuchen verwendete Klon weist eine Kreuzreaktivität sowohl mit der alpha- als auch mit der beta-Kette auf. Antikörper gegen S 100 werden oft für die Markierung von neuronalem Gewebe verwendet, da hier das Vorkommen der S 100-Proteine typisch ist. Aber auch bestimmte Zelltypen, bei denen eine Zugehörigkeit zur Makrophagen-/Monozyten-Zelllinie vermutet wird, weisen eine Markierung mit Antikörpern gegen S 100 auf.

#### 2.1.3.4 Antikörper Anti-S-100-A2

*Monoklonaler Antikörper, produziert in Hybridzellen aus Myelom-Zellen und Splenozyten von Mäusen*

*Vertrieb:* Sigma-Aldrich Corporation

*Klon:* SH-L1

*Isotyp:* IgG1/kappa

*Immunogen:* Calcium bindende Proteine vom Schweinemagen

*Epitop:* nicht näher bestimmt

*Molekulargewicht:* 10-12 kDa

*Positivkontrolle:* Tonsille

*Markierung:* zytoplasmatisch

*Hintergrund:* Der Antikörper Anti-S-100-A2 markiert das Calcium bindende Protein S 100 L, das der Familie der bereits unter 2.1.3.3 beschriebenen S 100-Proteine zugeordnet wird. Dieses Protein hat mit der alpha- und beta-Kette des S 100-Proteins oder anderen Calcium abhängigen Proteinen wie Calcyclin eine 43-47 prozentige Strukturhomologie. Der Antikörper Anti-S-100-A2 reagiert jedoch sehr spezifisch mit dem S 100 L-Protein. Mit den strukturell ähnlichen Calcium bindenden Proteinen wie Calmodulin und Parvalbumin oder den alpha- und beta-Ketten der S 100-Proteine zeigt sich keine Kreuzreaktion. So reagiert der Antikörper Anti-S-100-A2 zusätzlich mit Epitopen, die durch den Antikörper Anti-S-100 nicht markiert werden.

### 2.1.3.5 Antikörper hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII

*Polyklonale Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Kaninchen (Anti-H/PI) und Mäusen (Anti-H/PII)*

*Hersteller:* Die jeweiligen Antikörper wurden im Rahmen dieses Dissertationsprojekts als Auftragsarbeit von der Firma Davids Biotechnologie hergestellt.

*Immunogen:* Porkine Hyalozyten in Passage 1, durch eigene Präparation gewonnen.

*Herstellung:* Die fixierten Oberflächenantigene wurden den Tieren über einen Zeitraum von circa 6 Wochen mit 4 Injektionen verabreicht. Bei ausreichend hohem Titer wurden die gewonnenen Antikörper-Seren gekühlt gelagert und zeitnah an porkinen Zellen und Gewebsschnitten getestet.

### 2.1.4 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen

Im Folgenden werden die für die Durchführung der Alcianblau-Färbungen verwendeten Materialien aufgelistet:

Alcianblau 8GS, *Merck KGaA*

Kernechtrot-Lösung, *Merck*

Aluminiumsulfat-Lösung, *Merck*

CH<sub>3</sub>COOH (Essigsäure) 3%, *Merck*

0,1N HCl (Chlorwasserstoffsäure), *Merck*

Hyaluronidase, *Sigma-Aldrich*

Xylol, *Merck*

Histokit Eindeckmittel, *Carl Roth GmbH*

EtOH (Ethanol)

### 2.1.5 Geräte

Im Folgenden werden die für die Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet:

Mikroskop M650, *Wild Heerbrugg AG (Heerbrugg, Schweiz)*

Schüttelgerät KM-2 Akku, *Edmund Bühler GmbH und Co. (Bodelshausen)*

Mikrotom Leica/Jung RM 205, *Leica Microsystems (Nussloch)*

Kälteplatte Leica EG 1150 C, *Leica Microsystems*

Wasserbad, *Kunz instruments (Nynäshamn, Schweden)*

Wärmeraum 37°C

Wärmeplatte yellow line MSH basic, *IKA® Werke GmbH und Co. KG (Staufen)*

Rotina Zentrifuge, *Hettich GmbH und Co. KG (Tuttlingen)*

Kühlschrank -80°C, *Heraeus Holding GmbH (Hanau)*

Sterilbank LaminAir, *Holten A/S (Allerød, Dänemark)*

Inkubator IG 150 37°C, CO<sub>2</sub>-Gehalt 5 %, *Jouan GmbH (Unterhaching)*

Wasserbad 37°C, *Köttermann GmbH und Co. KG (Uetze/Hänigsen)*

Phasenkontrastmikroskop Axiovert 25, *Carl Zeiss AG (Jena)*

Digitalkamera Powershot G3, *Canon Deutschland GmbH (Krefeld)*

Kamera-Adapter Tube Bayonet, *Canon Deutschland GmbH*

Photomikroskop Leica DMR BE, *Leica AG (Wetzlar)*

## 2.2 Methodik

### 2.2.1 Zellkulturen

#### 2.2.1.1 Präparation der Hyalozyten

Im Folgenden wird die Präparation des Glaskörpers (GK) zur Gewinnung der Hyalozyten für die Zellkulturen beschrieben.

Für den Erhalt der porcinen Zellen wurden schlachtfrische Schweinebulbi in 0,9% NaCl-Lösung transportiert und bis zur zeitnahen Verarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt. Nach der Entfernung von Muskel- und Bindegewebe mithilfe von Eucleationschere und gezahnter Pinzette wurden die Bulbi im sterilen Becherglas mit 0,9% steriler NaCl-Lösung aufbewahrt.

Die humanen Bulbi wurden unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt, falls nach der Transplantation der Hornhaut eines humanen Spenders das Auge keiner weiteren Verwendung zugeführt werden konnte. Die post mortem Zeit betrug dabei zwischen 8 und 12 Stunden.

Die Präparation der Augen wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Die Bulbi wurden dort auf eine sterile Kompresse in eine Petrischale gelegt und mit einem Einmalskalpell circa 3 cm vom Limbus entfernt auf eine Länge von circa 1 cm eingeschnitten. An dieser Stelle wurde hierauf mit der Eucleationsschere kreisrund eingeschnitten. Danach wurde mit einer gezahnten Pinzette der ganze vordere Teil an der Hornhaut angehoben, so dass der GK sichtbar wurde. Dieser musste dann unter kontrolliertem Heben von der Netzhaut abgelöst werden, wozu zum Teil die Hilfe von ophta Augenstäbchen notwendig war. Hierbei musste darauf geachtet werden, die Linsen-hinterkapsel nicht zu beschädigen, um dadurch eine Verschleppung von Zellen zu vermeiden. Mithilfe von ophta Augenstäbchen wurden Membranen oder störende Zellen, wie zum Beispiel die sichtbaren schwarzen Pigmentepithelzellen, unter mikroskopischer Kontrolle entfernt. In einer Petrischale wurden jeweils fünf Glaskörper gesammelt, die dann mit 5-7 ml Medium gespült wurden, um eventuell noch vorhandenes nicht sichtbares Pigmentepithel zu entfernen.

Anschließend wurden die 5 Glaskörper mit einer 20 ml-Spritze aufgenommen und in eine neue sterile Petrischale ausgedrückt. Dieser Vorgang wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Nach dieser mechanischen Dissoziation der Zellen aus dem GK-Gerüst erfolgte die enzymatische Behandlung mit Collagenase Typ IA in der Konzentration 0,5 mg/ml, um die Hyalozyten aus dem Glaskörperverband zu lösen.

Dafür wurden 5-7 ml Enzym/Mediumgemisch in die Petrischale gegeben und für 1,5 - 3 Stunden in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Die Zelldissoziation wurde alle 30 Minuten mikroskopisch

kontrolliert. Wenn genug Einzelzellen vorlagen, wurde die Zellsuspension in 15 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und 7 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit frischem Medium resuspendiert. Danach wurde die Zellsuspension in Zellkulturflaschen T 25 oder T 75 überführt und das Gesamtvolumen auf 5 beziehungsweise 20 ml Medium aufgefüllt. Die Flaschen wurden in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt und die Zellen wurden bis zum Passagieren weiterkultiviert.

Sollten die Zellen zum weiteren Wachstum der Primärkulturen unmittelbar nach der Präparation auf Glasplättchen gesetzt werden, musste man folgendermaßen vorgehen:

nach der Zentrifugation wurden die Zellen mit exakt 1000 µl Medium, bemessen mit der Eppendorf-Pipette, resuspendiert.

Für die Zählung wurden 10 µl dieser Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt, 10 µl dieses Gemischs wurden dann in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in den 4 großen äußeren Quadranten zusammengezählt und daraus der Mittelwert berechnet. Multiplizierte man diesen Wert wegen der 1:2 Verdünnung mit 2 und 10<sup>4</sup>, erhielt man damit die Zellzahl pro ml.

In eine sterile 12-well-Platte wurde mit Hilfe einer gezahnten Pinzette in jedes well ein Glasplättchen gesetzt.

Da auf jedes Glasplättchen jeweils 4000 Zellen gesetzt werden sollten, konnte man die Zellsuspension nun so mit Medium verdünnen, dass sich 40.000 Zellen pro ml darin befanden. Jeweils 100 µl dieser verdünnten Suspension wurden möglichst luftblasenfrei mittels steriler Eppendorf-Pipette auf die Mitte der Glasplättchen gegeben. Die 12-well-Platte mit den frisch besetzten Glasplättchen wurde nun für 20 Minuten in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt, damit die erste Adhäsion der Zellen stattfinden konnte. Erst danach wurden in jedes well vorsichtig noch 2,5 ml Medium aufgefüllt.

#### 2.2.1.2 Präparation der Zellen des Ziliarkörper-Epithels

Im Folgenden wird die Präparation des Bulbus beschrieben, um daraus die Zellen des Epithels des Ziliarkörpers (*ciliary body* = CB) zu gewinnen.

Hierfür wurden schlachtfrische Schweinebulbi gekühlt in 0,9% NaCl transportiert und bis zur zeitnahen Verarbeitung, die 8-12 Stunden nach der Abholung erfolgte, unter fortwährender Kühlung aufbewahrt. Nachdem mehrere Bulbi mithilfe von gezahnter Pinzette und Enuclationsschere von Binde- und Muskelgewebe gesäubert wurden, wurden sie in ein steriles Becherglas mit 0,9% steriler Kochsalzlösung zur Aufbewahrung gegeben.

Der erste Teil der Präparation erfolgte im nicht sterilen Bereich bei Verwendung von sterilen Instrumentarien unter dem Operationsmikroskop. Ein gesäubertes Bulbus wurde auf eine sterile Kompresse in eine Petrischale gelegt und mit einem Einmalskalpell auf der Äquatorialebene mit circa 1 cm inzidiert. Durch diese Öffnung konnte der Bulbus mit der Eucleationsschere entlang der Äquatorialebene aufgeschnitten werden. Mithilfe eines sterilen ophta Augenstäbchens wurde dann der GK vorsichtig angehoben und großzügig vom Vordersegment entfernt. Bei diesem Vorgang bestand die Gefahr, dass sich mit dem GK ein Teil des Epithels von der Sklera löste. War die Entfernung des GK ohne Beschädigung des Vordersegments gelungen, wurde dieses zur Weiterbearbeitung verwendet, während das hintere Segment mit dem Sehnerv verworfen wurde.

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe eines Augenstäbchens die Linse durch Heraushebeln entfernt und ebenfalls verworfen.

Nun wurde der verbleibende vordere Eyecup zunächst halbiert, eine dieser Hälften wurde wiederum halbiert, so dass 2 Viertel zur Weiterverarbeitung zur Verfügung standen. Bei diesen Vierteln wurden unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Schere der vordere Irisbereich und Netzhautbereich so entfernt, dass nur der dünne Bereich des CB mit pars plana und Teilen der pars plicata verblieb.

Die Aderhaut mit dem so präparierten Bereich wurde mit einem Einmalskalpell vorsichtig von der Sklera abgehoben, es erfolgte nun unter mikroskopischer Kontrolle die Präparation des CB-Epithels. Die weitere Verarbeitung erfolgte in einer Petrischale unter der Sterilbank.

Dort folgte die vorsichtige mechanische Dissoziation der Gewebestücke mit Hilfe eines sterilen Skalpells. Für die anschließende enzymatische Dissoziation musste eine Mischung aus Enzym und Medium hergestellt werden.

Dazu wurden 0,1 mg der Collagenase Typ IA mit der Analysenwaage abgewogen und in 100 ml gebrauchsfertigem Medium gelöst. Nach der sterilen Filtration wurde diese Lösung in Aliquots von 10 ml eingefroren und bei -20°C gelagert. Zur Verwendung wurde die Lösung auf 0,5 mg/ml verdünnt.

Nachdem 6 ml dieser Lösung auf die Petrischale mit den Gewebestücken gegeben worden waren, wurde diese auf ein Schüttelgerät gestellt und im CO<sub>2</sub>-Schränk für 2,5-3 Stunden inkubiert. Im Abstand von 30 Minuten wurde die Zelldissoziation regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Wenn genug Einzelzellen vorlagen, wurde die Reaktion durch Zugabe von circa 8 ml Medium gestoppt. Danach wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und für 7 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert.

Für diejenigen Versuche, bei denen eine Weiterkultivierung der Zellen bis zur Passage 3 geplant war, wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit 5 ml beziehungsweise 20 ml frischem



Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche T 25 oder T 75 überführt. Diese Flasche wurde dann in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt.

Wurden für die Versuche Primärkulturen benötigt, wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben gezählt, so dass je 4000 Zellen auf ein Glasplättchen in eine 12-well-Platte gesetzt werden konnten.

#### 2.2.1.3 Präparation der Zellen des retinalen Pigmentepithels

Im Folgenden wird beschrieben, wie die Bulbi präpariert wurden, um daraus Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) für die Zellkultur zu gewinnen.

Hierfür wurden schlachtfrische porkine Bulbi gekühlt in NaCl gelagert und mit einer gezahnten Pinzette und einer Enucleationsschere von Muskel- und Bindegewebsresten befreit.

Bei den humanen Bulbi handelte es sich um Spenderaugen nach Hornhauttransplantation, die unserer Arbeitsgruppe nach dem Eingriff zur weiteren Verarbeitung überlassen wurden.

Die Präparation erfolgte unter der Sterilbank. Dort wurden die Bulbi auf eine sterile Kompresse in eine Petrischale gelegt, mit einem Einmalskalpell 3-5 mm vom Limbus entfernt eingeschnitten und mit einer Enucleationsschere kreisrund eingeschnitten. Der vordere Bereich wurde mit einer gezahnten Pinzette an der Hornhaut angehoben und der GK unter kontrolliertem Heben von der Netzhaut gelöst. Nachdem die Netzhaut vorsichtig von dem leeren Eyecup gelöst wurde, wurde dieser vorsichtig mit dem Finger von innen nach außen gestülpt. Anschließend konnte man das schwarze Pigmentepithel behutsam mit dem Skalpell von der Aderhaut abschaben. Zur Weiterkultivierung über die Primärkultur hinaus wurden die Zellen mit 5 beziehungsweise 20 ml Medium in eine Zellkulturflasche T 25 beziehungsweise T 75 überführt und in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Wurden RPE in PK für die Versuche benötigt, wurden die präparierten Zellen gleichmäßig auf die in eine 12-well-Platte gesetzten Glasplättchen verteilt. Da die Zellen des RPE von den Gewebestücken aus wachsen, konnte in diesem Fall keine enzymatische Dissoziation der Zellen und demzufolge auch keine exakte Zellzählung mit Zählkammer durchgeführt werden.

#### 2.2.1.4 Allgemeine Kulturbedingungen

Die wie unter 2.2.1.1, 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschriebenen präparierten Zellen wurden entsprechend der Versuchsreihe in Zellkulturflaschen oder auf Glasplättchen in 12-well-Platten kultiviert.

Für die Versuchsgruppen I und II der Immunmarkierungen wurden die einzelnen Zellkulturen in Primärkultur (PK) beziehungsweise Passage 3 (P3) bis zum konfluenten Wachstum auf den

Glasplättchen kultiviert.

Das Kulturmedium wurde hergestellt aus 84% D-MEM, 15% fetalem bovines Serum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin.

Bei der Durchführung des Mediumwechsels wurde das vorhandene Medium abgesaugt, danach wurde in einer Zellkulturflasche mit circa 5-10 ml, in den 12-well-Platten mit circa 1 ml pro well PBS gespült. Diese Pufferlösung enthielt kein Magnesium und Kalzium und hatte den für die Zellkulturen geeigneten pH-Wert 7,4. Nach Absaugen dieses Puffers wurde wiederum neues Medium hinzugegeben, 5 ml in T 25 Kulturflaschen, 20 ml in T 75 Kulturflaschen und je 2,5 ml pro well.

In der Regel wurde der Mediumwechsel zweimal wöchentlich durchgeführt.

Das Vorgehen für den ersten Mediumwechsel nach Präparation und erster Inkubation der Zellen unterschied sich jedoch bei den PK der unterschiedlichen Zelltypen:

so war bei den Zellen des CB-Epithels häufig bereits nach 24 Stunden eine starke Zelladhäsion und vermehrtes Zellwachstum zu sehen. Da die Zellen in PK relativ schnell verkeimten, wurde in diesen Fällen der Mediumwechsel bereits einen Tag nach Präparation und Anlegen der Zellkulturen vorgenommen.

Die Hyalozyten hingegen benötigten in PK häufig mehrere Tage bis zur Adhäsion auf den Glasplättchen beziehungsweise auf dem Boden der Zellkulturflasche. So wurden in diesen Fällen täglich mikroskopisch die Adhäsion und eventuelle Verkeimung kontrolliert. Erst nach Anwachsen der Zellen konnte der erste Mediumwechsel durchgeführt werden.

Bei den RPE-Zellkulturen konnte wegen relativ rascher Zelladhäsion nach 1-2 Tagen und geringer Verkeimungstendenz meist von Beginn an der regelmäßige Mediumwechsel an 2 Tagen in der Woche eingehalten werden.

#### 2.2.1.5 Passagieren

Im Folgenden wird das Passagieren der Zellkulturen, um diese auf weitere Zellkulturflaschen zu verteilen oder sie auf Glasplättchen zu setzen, beschrieben.

Hierfür wurde zuerst das Medium abgesaugt, danach wurden die Zellen auf unter 2.2.1.4 beschriebene Weise mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde mit PBS verdünntes EDTA-Trypsin in die Zellkulturflaschen gegeben, pro T 25 Flasche 5 ml, pro T 75 Flasche 10 ml Lösung. Bei den verschiedenen Zellkulturen waren hierbei unterschiedliche Verdünnungen von Trypsin notwendig. Bei den Hyalozyten- und CB-Epithel-Kulturen wurde eine Verdünnung von 1:10 Trypsin:EDTA/PBS verwendet. Diese Lösung wurde für 5-10 Minuten inkubiert. Da sich die

RPE-Zellen mit dieser Verdünnung relativ schlecht vom Boden der Kulturflaschen lösen, wurde das Trypsin hier im Verdünnungsverhältnis 1:5 angewendet, bei einer Einwirkzeit von 5-15 Minuten. Während der Inkubation der Lösung wurden die Zellkulturflaschen in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden musste immer wieder sowohl makroskopisch als auch unter dem Mikroskop kontrolliert werden. Dabei erfolgte nach den ersten sichtbaren Zeichen der Zellablösung circa alle 60 Sekunden eine mikroskopische Kontrolle, da auch nach längerer Einwirkzeit ohne sichtbare Ablösung dann schließlich innerhalb sehr kurzer Zeit meist die Ablösung des gesamten Zellrasens stattfand. Wegen der potentiell zellschädigenden Wirkung des Trypsins wurde die Einwirkzeit so kurz wie möglich gehalten. Hatten sich die Zellen vom Boden abgelöst, wurde die Reaktion durch Zugabe einer Menge Medium, die immer mindestens der Menge des verwendeten Trypsin-Gemisches entsprach, gestoppt. Mit einer sterilen Pipette wurde das Gemisch aufgenommen, wobei man mit einem bereits aufgenommenen Teil der Flüssigkeit immer wieder den Flaschenboden spülte und diese dann wieder aufnahm, um die Zellen möglichst vollständig aufzunehmen. Diese Zellsuspension wurde dann in einen 15 ml Falcon Tube überführt und 7 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert. Sollten die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden, wurde mit einem Volumen von circa 5-10 ml resuspendiert und diese Zellsuspension zu gleichen Teilen auf 3 neue Flaschen aufgeteilt. Dann wurde den Flaschen noch diejenige Menge an Medium hinzugefügt, dass sich insgesamt 5 ml Flüssigkeit in den Flaschen T 25 und 20 ml Flüssigkeit in den Flaschen T 75 befand.

Sollten die Zellen auf Glasplättchen gesetzt werden, wurde das Zellpellet mit 5 ml resuspendiert. Danach wurden die Zellen wie unter 2.2.1.1 beschrieben gezählt und so auf den Glasplättchen verteilt, dass sich jeweils 4000 Zellen in jedem well befanden.

#### 2.2.1.6 Einfrieren

Nachfolgend wird das Einfrieren von Zellen beschrieben. Für diesen Vorgang musste ein spezielles Einfriermedium hergestellt werden. Zu 85 ml des herkömmlichen Mediums, das 15% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin enthält, wurden 10 ml DMSO und 5 ml Glycerin hinzugefügt. Nachdem man diese Substanzen miteinander gemischt hatte, konnte das Medium nach steriler Filtration bei -20°C gelagert werden.

Nachdem die einzufrierenden Zellen wie unter 2.2.1.5 beschrieben trypsiniert und zentrifugiert worden waren, wurde das Zellpellet mit exakt 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Nach anschließender Zählung in der Neubauer-Zählkammer konnte die Zellsuspension so verdünnt

werden, dass sich die gewünschte Zellzahl in einem ml Medium befindet. Es wurde in der Regel auf eine Zellmenge von 500.000/ml verdünnt. Jeweils 1 ml der Zellsuspension wurden in vorbereitete Kryoröhrchen pipettiert. Danach wurden die Zellen langsam in Isopropanol eingefroren und bei -80°C in der Gefriertruhe gelagert. Nach 2-3 Tagen wurden die Kryoröhrchen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff gegeben.

#### 2.2.1.7 Auftauen

Im Folgenden wird das Auftauen der in Kryoröhrchen gelagerten Zellen beschrieben.

Die Zellen wurden aus der -80°C Gefriertruhe oder dem Stickstofftank sofort in ein 37°C warmes Wasserbad überführt. Die Röhrchen durften nur solange im Wasserbad gehalten werden, bis gerade das letzte Eisklumpchen verschwunden war. Nach kurzer Sprühdesinfektion der Kryoröhrchen, wurde der Inhalt mit einer 2 ml Pipette in eine Kulturflasche T 25 überführt und 5 ml herkömmliches Medium hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt. Nach 24 Stunden erfolgte ein erneuter Wechsel des Nährmediums.

### 2.2.2 Histologische Methoden

#### 2.2.2.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Zur Durchführung der Immunmarkierungen an Schnitten aus porkinen und humanen Augen sowie zum Erhalt von Kontrollgewebe aus humanen Tonsillen wurden Paraffinblöcke hergestellt.

Bei der Herstellung dieser Präparate wurden die Schweinebulbi schlachtfrisch, die humanen Tonsillen und Spender-Augen mit möglichst kurzer post mortem-Zeit in sterilem NaCl transportiert. Die Augen wurden auf die unter 2.2.1.1 beschriebene Weise so präpariert, dass man den vorderen Eyecup mit entferntem GK und Linse vor sich liegen hatte. Unter dem Mikroskop konnte man nun einen Gewebestreifen, der den Bereich des CB enthielt, mit dem Skalpell heraus schneiden.

Bei den Tonsillen wurde ein circa 3x2x2 cm großes Gewebestück mit dem Skalpell herausgeschnitten.

Nach dieser Präparation wurden die jeweiligen Gewebestücke für circa 14 Stunden in 4% Paraformaldehyd (PFA) zur Fixierung gegeben. Am nächsten Tag konnte man die Präparate im Fixans in die Pathologie des Klinikums bringen, wo die Einbettung in Paraffin durchgeführt wurde. Diese Paraffin-Blöcke konnten jetzt mit dem Mikrotom geschnitten werden, bei den

Schnitten der porkinen und humanen Bulbi in einer Dicke von 5  $\mu\text{m}$ , bei den Tonsillen mit 2  $\mu\text{m}$  Dicke. Nach dem Aufziehen auf einen Objektträger mussten die Präparate bei 37°C im Wärmerraum über Nacht getrocknet werden. Die Präparate wurden beschriftet und konnten dann im Präparatekasten gelagert werden.

#### 2.2.2.2 Herstellung der Präparate mit porkinem Glaskörper

Im Folgenden wird beschrieben, wie die porkinen GK auf die Objektträger gezogen wurden.

Zu diesem Zweck musste der GK wie unter 2.2.1.1 beschrieben präpariert und gespült werden. Statt den GK in einer Spritze aufzuziehen wurde er nochmals mit steriler PBS-Lösung gereinigt und danach für 30 Minuten in ein steriles Becherglas mit 4% PFA gelegt. Danach wurde der GK vorsichtig mit einer gläsernen Pasteurpipette leicht angesaugt, um ihn möglichst rasch auf einen bereitgestellten Objektträger zu ziehen. Im Anschluss wurde dieser Objektträger für 30 Minuten auf eine Wärmeplatte gelegt. Diese so hergestellten GK-Präparate wurden bereits am nächsten Tag für die Immunmarkierungen verwendet.

#### 2.2.3 Immunhistochemie

##### 2.2.3.1 Immunmarkierungen mit Antikörpern

###### 2.2.3.1.1 Vorbereitung der Immunmarkierungen

Im Folgenden werden die unmittelbar vor der Durchführung der Immunmarkierungen notwendigen Vorbereitungen der Zellkulturen, Paraffinpräparate und auf Objektträger gezogenen Glaskörper beschrieben, die sowohl für Versuchsgruppe I als auch für Versuchsgruppe II gelten.

Bei den auf Glasplättchen konfluent gewachsenen Zellkulturen war unmittelbar vor der Immunmarkierung eine Fixierung in 4% PFA notwendig. Zur Herstellung wurden 20 g PFA auf 500 ml PBS-Lösung bei 70°C gelöst, die klare Lösung wurde danach mit dem pH-Meter auf einen pH-Wert von 7 eingestellt und gefroren gelagert. Deshalb musste das PFA kurz im 37°C Wasserbad aufgetaut werden. Währenddessen wurde unter der Sterilbank aus den Zellkulturen das Medium abgesaugt, und jedes well kurz mit sterilem PBS gespült. Dann konnten pro well 500  $\mu\text{l}$  PFA mit der sterilen Pipette eingefüllt werden. Nach einer Einwirkzeit von 20 Minuten konnte das PFA abgesaugt werden, danach wurde jedes well mit circa 1 ml PBS befüllt.

Nun konnte im nicht sterilen Bereich weiter gearbeitet werden. Die Objektträger wurden vor der

Immunmarkierung in ein Färbegestell gesteckt, um so die Entparaffinierung durchzuführen. Das Färbegestell wurde nacheinander in folgende Flüssigkeiten gegeben:

1. Xylol 10 Minuten
2. Xylol 10 Minuten
3. 100% EtOH (Ethanol) 2 Minuten
4. 100% EtOH 2 Minuten
5. 90% EtOH 2 Minuten
6. 90% EtOH 2 Minuten
7. 70% EtOH 2 Minuten
8. 70% EtOH + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) 10 Minuten

Nach der Entparaffinierung wurde jedes Präparat mit Proteinase K Lösung inkubiert. Eine solche proteolytische Vorbehandlung verbessert die immunhistochemische Reaktivität der Antigene. Dazu musste diese Lösung hergestellt werden, in dem man einen Tropfen (ca. 40 µl) Proteinase K in 2 ml 0,05 M Tris/HCl Puffer (pH 7,5-7,7) löste. Diese Lösung wurde danach kurz im 37°C Wasserbad erwärmt. Jetzt wurden einige Tropfen der Lösung auf die in eine Färbeschüssel gelegten Objektträger gegeben, dabei musste jedes Präparat vollständig mit Proteinase K Lösung bedeckt sein. Nach 6 Minuten Inkubationszeit wurde die Lösung mit 0,01% PBS abgewaschen. Zur Herstellung dieser PBS-Lösung, die im Verlauf der Immunmarkierung immer wieder verwendet wurde, wurde eine Tablette Sigma PBS in 200 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Nun konnten die Objektträger in Coverplates gesteckt werden, die dann in die dazugehörige Inkubationskammer gesetzt wurden, um darin die Immunmarkierung durchzuführen.

Die tags zuvor auf Objektträger gezogenen GK wurden lediglich für 6 Minuten in horizontaler Lage mit einigen Tropfen 0,01% PBS bedeckt und anschließend für 6 Minuten mit Proteinase K inkubiert. Jeweils die Hälfte der Glaskörper wurden vor Durchführung der Markierung für 3 Stunden mit Hyaluronidase 0,1mg/ml inkubiert.

Nach diesen vorbereitenden Behandlungen konnte die immunhistochemische Markierung an Zellkulturen und Paraffinschnitten gemäß Protokoll durchgeführt werden.

#### 2.2.3.1.2 Durchführung der Immunmarkierungen

Im Folgenden wird die Durchführung der Immunmarkierungen, gültig für die Markierung mit den jeweiligen Antikörpern aus den Versuchsgruppen I und II, beschrieben.

Die jeweiligen Antikörper waren zuvor in 1,5 ml Eppendorf-Cups mit Antikörper-Verdünnungs-Lösung im entsprechenden Verhältnis verdünnt worden. Alle zu inkubierenden Substanzen wurden

nur kurz für den jeweiligen Arbeitsschritt aus dem Kühlschrank genommen und wurden grundsätzlich folgendermaßen aufgetragen:

bei den in der 12-well-Platte befindlichen Glasplättchen wurde jeweils die Menge von der entsprechenden Substanz hinzugefügt, dass die Plättchen damit bedeckt wurden. Es wurde immer darauf geachtet, dass die Plättchen vom Flüssigkeitsfilm bedeckt blieben. Bei den Objektträgern in den Coverplates wurde die betreffende Flüssigkeitsmenge in die dafür vorgesehene Öffnung getropft. Die Konstruktion der Coverplates sollte die gleichmäßige Verteilung der Flüssigkeit und ihr Verweilen während der Inkubationszeit gewährleisten.

Nach der Inkubation einer Substanz mussten Objektträger und Glasplättchen immer gewaschen werden. Bei den Plättchen wurde dabei zuerst die inkubierte Flüssigkeit mit einer 2,5 ml Pasteurpipette abgesaugt, danach wurde mit einer neuen Pasteurpipette circa 1 ml 0,01% PBS in das well gefüllt. Nach wenigen Sekunden konnte die Pufferlösung mit der Pipette entfernt werden. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Bei den Coverplates musste zum Waschen der Präparate zweimal hintereinander jeweils circa 1,5 ml PBS mit der Pipette eingefüllt werden.

Die immunhistochemische Markierung wurde nach folgendem Färbeprotokoll durchgeführt:

1. Superblock-Peroxidase für 5 Minuten inkubieren, danach aus den wells mit Pipette absaugen, kein Waschvorgang
2. Primären Antikörper 60 Minuten inkubieren
3. Waschvorgang mit 0,01% PBS
4. Sekundären, biotinylierten Antikörper 20 Minuten inkubieren
5. Waschen mit 0,01% PBS
6. Gebrauchsfertiges HRP-Konjugat 20 Minuten inkubieren
7. AEC-Substrat 2 x 5 Minuten inkubieren
8. Reaktion mit Leitungswasser stoppen

Bei den 12-well-Platten wurde das Wasser hierauf mit einer Pipette abgesaugt. Die Paraffinschnitte wurden nach diesem Arbeitsschritt für die weitere Bearbeitung aus den Coverplates herausgenommen und wie oben beschrieben in eine Färbeschüssel gelegt.

Hierauf folgte die Gegenfärbung mit Mayer's Hämatoxylin. In jedes well und auf alle Objektträger wurden circa 1 ml dieser Lösung gegeben, die circa 1 Minute einwirken musste. Danach konnte mit Leitungswasser das sogenannte 'Bläuen' durchgeführt werden. Bei den Paraffinschnitten wurde der blaue Farbstoff einfach vorsichtig mit Leitungswasser heruntergespült. Danach wurden diese Objektträger wieder in ein Färbegestell geordnet und in einen mit Leitungswasser gefüllten

Glaskasten gesetzt, in dem sie wenige Minuten bis zur Eindeckung verblieben. In die wells wurde mit einer Pasteur-Pipette immer wieder Leitungswasser gefüllt und abgesaugt, bis das Wasser klar erschien.

Danach erfolgte die Eindeckung der Präparate mit Aquatex-Eindeckmittel.

Die Glasplättchen wurden mithilfe einer gezahnten Pinzette aus dem well gehoben. Dann wurde ein möglichst luftblasenfreier Tropfen des Eindeckmittels auf die mit Zellen bewachsene Seite gegeben und das Plättchen mit dieser Seite auf den Superfrost-Objekträger gegeben.

Die Objekträger mit Paraffinschnitten wurden aus dem Glaskasten herausgenommen und mit einem 24x50 mm Deckglas, das mittig mit einem dünnen Streifen Aquatex überzogen wurde, eingedeckt.

Falls sich dennoch kleine Luftbläschen unter den Deckgläsern gebildet hatten, konnten diese durch vorsichtigen Druck mit der Pinzette auf das Glas entfernt werden.

Alle Präparate wurden mit dem betreffenden Datum und genauen Angaben über die Zellkultur beschriftet. Dann wurden diese bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.3.2 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen

#### 2.2.3.2.1 Herstellung der Lösungen

Zu Beginn der Versuche wurden die Alcianblau-Farbstoffe und die Kernechtrot-Lösung hergestellt.

Für den Alcianblau-Farbstoff zur Markierung der Sulfat- und Carboxylgruppen wurde 1 g Alcianblau 8GS in 100 ml 3% Essigsäure gelöst. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 2,5 wurde die Lösung steril filtriert. Für die Farbstoff-Lösung, die sulfatierte Glykosaminoglykane (GAG) anfärben sollte, wurde 1 g Alcianblau 8GS in 100 ml 0,1 N Chlorwasserstoffsäure (HCl) gelöst. Der pH wurde auf 1,0 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Für die Herstellung der Kernechtrot-Lösung wurden 0,1 g Kernechtrot in 100 ml wässriger Aluminiumsulfat-Lösung heiß gelöst. Diese Lösung musste vor Gebrauch ebenfalls steril filtriert werden.

#### 2.2.3.2.2 Durchführung der Alcianblau-Färbungen

Bei jeweils der Hälfte der Glasplättchen wurde vor Durchführung der Färbung das Medium abgesaugt und pro well 1 ml Hyaluronidase der Konzentration 0,1 mg/ml hinzugefügt. Dann wurde die 12-well-Platte für 25 Minuten in den CO<sub>2</sub>-Inkubator gestellt.

Danach konnten Medium und Hyaluronidase abgesaugt und die Plättchen mit PBS gewaschen werden.



Folgend wurden in jedes well für 20 Minuten zur Fixierung 500 µl PFA gegeben.

Die Färbung wurde gemäß folgendem Protokoll durchgeführt, wobei von jeder zu inkubierenden Substanz circa 1 ml in das entsprechende well gegeben wurde:

1. Aqua dest. 3 Minuten
2. 0,1 N HCl (pH 1,0) beziehungsweise 3% Essigsäure (CH<sub>3</sub>COOH) (pH 2,5) 3 Minuten
3. Alcianblau-Farbstoff pH 1,0 beziehungsweise pH 2,5
4. Kurz in 0,1 N HCl (pH 1,0) beziehungsweise 3% Essigsäure (pH 2,5) spülen
5. Leitungswasser 2 Minuten
6. Kernechtrot 7 Minuten
7. Aqua dest. 3 Minuten
8. 96% EtOH 3 Minuten
9. 100% EtOH 3 Minuten
10. 100% EtOH 3 Minuten

Nach diesem Vorgang wurden die Präparate mit der gezahnten Pinzette aus den wells entfernt und für circa 1 Minute in ein Becherglas mit Xylol gehalten. Schließlich wurde auf jedes Glasplättchen ein Tropfen Histokit-Lösung gegeben, um diese zum Eindecken auf Superfrost-Objektträger zu bringen. Die Präparate wurden mit dem Datum und Angaben über die Zellkultur beschriftet.

#### 2.2.4 Versuchsdesign

Im Folgenden werden der Versuchsaufbau der immunhistochemischen Markierungen mit Antikörpern der Versuchsgruppe I und II sowie der Färbungen der extrazellulären Matrix (ECM) mit Alcianblau-Farbstoffen dargestellt.

##### 2.2.4.1 Immunmarkierungen mit Antikörpern

In diesen Versuchsgruppen wurden mit verschiedenen porkinen und humanen Zellkulturen, Paraffinschnitten und GK-Präparaten immunhistochemische Markierungen durchgeführt.

In der Versuchsgruppe I wurden hierbei die Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 angewendet.

In der Versuchsgruppe II wurden an den verschiedenen porkinen Zellkulturen, Paraffinschnitten und GK-Präparaten Antikörper getestet, die durch Immunisierung von Kaninchen und Mäusen mit

Schweine-Hyalozyten eigens für diese Arbeit hergestellt worden waren: die Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII. Diese Antikörper wurden auf ihre Spezifität für Hyalozyten hin geprüft.

Die für die Immunmarkierung verwendeten Zellkulturen wurden auf Glasplättchen in 12-well-Platten kultiviert.

Alle Primärkulturen für die immunhistochemischen Markierungen wurden nach der Präparation zum Wachstum auf Glasplättchen gesetzt.

Bei den Zellkulturen aus Passage 3 handelte es sich teilweise um Zellen, die aufgetaut wurden, teilweise wurden die Zellen durchgehend von der Primärkultur bis zur Passage 3 kultiviert.

Die Glaskörper-Präparate wurden immer einen Tag vor Durchführung der immunhistochemischen Markierung hergestellt.

Jeder Einzelversuch wurde mindestens dreimal wiederholt und wurde mit Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt.

#### 2.2.4.1.1 Versuchsgruppe I: Immunmarkierungen mit den Antikörpern Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2

In dieser Versuchsgruppe wurde jeder der 3 Antikörper an folgenden Zellkulturen und Paraffinschnitten angewendet:

- Porkine Hyalozyten, Zellen des CB-Epithels und RPE-Zellen mit jeweils 5 Wiederholungsversuchen in Passage 3 (P3) und mit 3 Wiederholungsversuchen in Primärkultur (PK).
- Humane Hyalozyten und RPE-Zellen mit jeweils 5 Wiederholungsversuchen mit Zellen der P3.
- Paraffinschnitte des Auges mit CB-Epithel mit jeweils 5 Wiederholungsversuchen bei humanen und porkinen Präparaten.
- Aus Schweine-Bulbi präparierte Glaskörper auf Objektträgern mit je 3 Wiederholungsversuchen.

Es muss erwähnt werden, dass bei den humanen Zellkulturen nur für die ersten beiden Versuchsreihen Zellen der Passage 3 verwendet werden konnten, die direkt nach der Präparation weiterkultiviert wurden und deshalb zu Beginn der Experimente für diese Arbeit zur Verfügung standen. Für die weiteren Versuche wurden aufgetaute humane Hyalozyten und RPE-Zellen verwendet, die zuvor entsprechend 2.2.1.1 und 2.2.1.3 präpariert und hierauf wie unter 2.2.1.6 dargestellt eingefroren worden waren. In der experimentellen Phase dieser Arbeit standen keine weiteren Bulbi von humanen Hornhaut-Spendern zur Verarbeitung zur Verfügung.

Die Tabellen 2.1 und 2.2 stellen die für Versuchsgruppe I für jeden der zu testenden Antikörper verwendeten Zellen und histologischen Präparate nochmals im Überblick dar.

Die Verdünnung der Antikörper wurde in Vorversuchen um die von den Herstellern angegebenen Verdünnungs-Empfehlungen variiert, um die am besten geeignete Verdünnung zu ermitteln.

Der Antikörper Anti-CD-68, vom Hersteller in einer Verdünnung von 1:50 empfohlen, wurde in Verdünnungen zwischen 1:20 und 1:100 getestet. Die optimale Verdünnung wurde mit 1:100 ermittelt.

Beim Antikörper Anti-S-100 wurde die Verdünnung zwischen 1:50 und 1:200 variiert, wobei die optimale Verdünnung mit 1:100 der Hersteller-Empfehlung entsprach.

Ebenso wurde der Antikörper Anti-S100-A2 in Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 getestet. Bei diesem Antikörper entsprach die von uns im weiteren Verlauf angewandte Verdünnung von 1:1000 ebenfalls der Empfehlung des Herstellers.

Bei den Immunmarkierungen der Versuchsgruppe I wurden sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurde eines der entsprechenden bewachsenen Glasplättchen beziehungsweise einer der Paraffinschnitte statt mit primärem Antikörper nur mit Verdünnungs-Reagens inkubiert. Als Positivkontrollen dienten Paraffinschnitte von humanen Tonsillen, die ebenfalls mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert wurden. Die positive Markierung der Zellen der Tonsille diente als Beweis für die korrekte Durchführung der Methodik und bewies die Funktionsfähigkeit des Antikörpers.

*Tabelle 2.1:* Verwendete Zellkulturen Versuchsgruppe I

	<i>Wiederholungs- versuche in PK</i>	<i>Wiederholungs- versuche in P3</i>
<b>Porkine Zellen</b>		
Hyalozyten	<b>3</b>	<b>5</b>
RPE-Zellen	<b>3</b>	<b>5</b>
Zellen des CB-Epithels	<b>3</b>	<b>5</b>
<b>Humane Zellen</b>		
Hyalozyten	-	<b>5</b>
RPE-Zellen	-	<b>5</b>

*Tabelle 2.2:* Verwendete histologische Präparate Versuchsgruppe I

	<i>Wiederholungsversuche</i>
<b>Porkine Präparate</b>	
Gewebsschnitte mit Ziliarkörper	<b>5</b>
Glaskörper	<b>3</b>
<b>Humane Präparate</b>	
Gewebsschnitte mit Ziliarkörper	<b>5</b>

#### 2.2.4.1.2 Versuchsgruppe II: Immunmarkierungen mit Antikörpern, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII

In dieser Versuchsgruppe wurde die Reaktivität der Antikörper-Seren, die durch die Immunisierung von Kaninchen (Anti-Hyalozyten/Polyklonal I: Anti-H/PI) und Mäusen (Anti-Hyalozyten/Polyklonal II: Anti-H/PII) mit porkinen Hyalozyten hergestellt worden waren, an den verschiedenen Zelltypen und Präparaten getestet. An folgenden Zellen und histologischen Präparaten wurden Immunmarkierungen mit den Antikörpern Anti-H/PI und Anti-H/PII durchgeführt:

- Porkine Hyalozyten, RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels mit jeweils 5 Wiederholungsversuchen in P3 und 3 Wiederholungen in PK.
- Paraffinschnitte mit Ziliarkörper von Schweineaugen mit ebenfalls 5 Wiederholungsversuchen sowie 3 Wiederholungsversuche mit auf Objektträgern fixierten Glaskörpern.

Die Tabellen 2.3 und 2.4 geben einen Überblick über die in Versuchsgruppe II für jeden der zu testenden Antikörper verwendeten Zellkulturen und histologischen Präparate.

Auch hier wurde in Vorversuchen die Verdünnung bei beiden Antikörper-Seren zwischen 1:5 und 1:50 variiert. Als optimal ergab sich eine Verdünnung von 1:10.

Bei jedem der Versuche wurde eine Negativkontrolle durchgeführt, das heißt, mindestens ein Präparat pro Versuch wurde statt mit dem Antikörper nur mit Verdünnungs-Reagens inkubiert. Eine Positivkontrolle stand bei dieser Versuchsgruppe dahingehend nicht zur Verfügung, da bei diesen durch Immunisierung mit Hyalozyten hergestellten Antikörpern die Hyalozytenkultur selbst die einzige Positivkontrolle darstellte.

*Tabelle 2.3:* Verwendete Zellkulturen Versuchsgruppe II

	<i>Wiederholungs- versuche in PK</i>	<i>Wiederholungs- versuche in P3</i>
<b>Porkine Zellen</b>		
Hyalozyten	<b>3</b>	<b>5</b>
RPE-Zellen	<b>3</b>	<b>5</b>
Zellen des CB-Epithels	<b>3</b>	<b>5</b>

*Tabelle 2.4:* Verwendete histologische Präparate Versuchsgruppe II

	<i>Wiederholungsversuche</i>
<b>Porkine Präparate</b>	
Gewebsschnitte mit Ziliarkörper	<b>5</b>
Glaskörper	<b>3</b>

#### 2.2.4.1.3 Beurteilung

Die Präparate aus Versuchsgruppe I und II wurden nach Durchführung der Immunmarkierungen mikroskopisch beurteilt.

Durch die Färbung mit Mayer's Hämatoxylin erschienen die Zellkerne tiefblau, die übrigen Strukturen wurden ebenfalls blau gefärbt.

Von den Antikörpern markierte Strukturen waren durch die Anwendung des AEC-Substrats rot gefärbt sichtbar.

Ein Versuch wurde aus der Wertung genommen, wenn sich durch den Vorgang der Immunmarkierung die typische Morphologie der Zellen verändert hatte. Auch musste die Struktur des Gewebes auf den Paraffinschnitten eindeutig erkennbar sein, eine Ablösung vom Objektträger galt als Ausschlusskriterium.

Zur weiteren Prüfung der Gültigkeit des Versuchs wurden zuerst die Positiv- und Negativkontrollen, danach jedes Präparat einzeln geprüft. Dabei diente eine Positivkontrolle mit markierten Strukturen als Beweis für die Funktionsfähigkeit des jeweiligen Antikörpers und die korrekte Durchführung der Methodik. Auf den Negativkontrollen hingegen durften keine eindeutig markierten Zellen zu finden sein.

Danach wurde jedes einzelne Präparat beurteilt. Nach Prüfung der grundsätzlichen Qualität des Präparates bezüglich der Hämatoxylin-Färbung und eventuellen rötlichen Überlagerungen durch

das AEC-Substrat wurden rot markierte Strukturen gesucht. Zellen galten als eindeutig markiert, wenn eine rote Färbung, die auf die Zellgrenzen beschränkt ist, zu finden war. So wurde bei jedem Präparat der Anteil der gefärbten Strukturen und Zellen sowie Intensität und genaue Lokalisation der Markierung beurteilt. Nachdem bei den auf den Glasplättchen gewachsenen Zellen bei der mikroskopischen Auswertung der Anteil der markierten Zellen auf dem Präparat ermittelt werden sollte, erfolgte vor allem zum besseren Vergleich der einzelnen Resultate untereinander die Einteilung der Markierungen in Grad I-V. Hierbei entsprach der jeweilige Markierungsgrad einem bestimmten anteiligen Prozentsatz der angefärbten Zellen aller auf dem Präparat befindlichen Zellen.

Die systematische Einteilung wird in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2.5: Systematische Einteilung der Resultate der Immunmarkierungen mit Zellkulturen

	<i>Anteil der markierten Zellen in %</i>
Grad I	1 - 20
Grad II	21 - 40
Grad III	41 - 60
Grad IV	61 - 80
Grad V	81 - 100

#### 2.2.4.2 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen

##### 2.2.4.2.1 Versuchsaufbau

In dieser Versuchsreihe wurden porkine Hyalozyten, RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels mit Alcianblau, einem Farbstoff zur selektiven Färbung von Mukosubstanzen, behandelt. Dabei wurden 2 Alcianblau-Farbstoffe mit verschiedener pH-Wert-Einstellung verwendet: der Farbstoff mit einem pH-Wert von 2,5 ermöglicht den Nachweis saurer Mukosubstanzen ohne Unterscheidung von Carboxyl- und Sulfatgruppen. Die auf einen pH-Wert von 1,0 eingestellte Lösung färbt lediglich die sulfatierten Gruppen an. So lassen sich durch die Markierung mit der Lösung des pH-Werts 2,5 extrazelluläre Glykosaminoglykane (GAG) in den Zellkulturen nachweisen, die Markierung extrazellulärer Matrix mit der Lösung des pH-Werts 1,0 trägt durch

den Nachweis sulfatierter GAG zur weiteren Identifizierung dieser extrazellulären Strukturen bei. Da lediglich die Hyaluronsäure (HA) nicht sulfatiert ist, können durch diese Färbungen Rückschlüsse auf das Vorliegen von extrazellulärer HA in den einzelnen Zellkulturen gezogen werden.

Die Alcianblau-Färbungen wurden mit auf Glasplättchen gewachsenen Zellen durchgeführt.

Für jeden Einzel-Versuch wurden 4 bewachsene Glasplättchen derselben Zellkultur verwendet. Jeweils 2 der Plättchen wurden mit Alcianblau-Farbstoff pH 1,0, die anderen beiden mit Alcianblau-Farbstoff pH 2,5 inkubiert. Wiederum jeweils eines der beiden Glasplättchen wurde zuvor für 25 Minuten mit Hyaluronidase in der Konzentration 0,1 mg/ml vorbehandelt. Die Hyaluronidase ist ein Enzym, das HA abbaut. Es katalysiert die hydrolytische Spaltung glykosidischer Bindungen in Hyaluronsäure und Chondroitinsulfaten und führt damit zur Depolymerisation.

Tabelle 2.6 stellt die für diese Versuche verwendeten Zellkulturen dar.

*Tabelle 2.6:* Verwendete Zellkulturen Alcianblau-Färbungen

	<i>Wiederholungsversuche</i>
<b>Porkine Zellkulturen (P 3)</b>	
Hyalozyten	<b>5</b>
RPE-Zellen	<b>5</b>
Zellen des CB-Epithels	<b>5</b>

#### 2.2.4.2.2 Beurteilung

Nach Durchführung der Versuche wurden die Präparate mikroskopisch beurteilt.

Die markierten Mukosubstanzen treten durch die Färbung mit Alcianblau leuchtend blau hervor, die Kerne erscheinen hellrot, der Hintergrund zartrosa.

Zuerst wurde beurteilt, ob die Zellkerne deutlich rot gefärbt waren. War damit die Funktion der Kernecht-Lösung gezeigt, konnte der Versuch als gültig eingeschlossen werden. Grundsätzlich wurde bei jedem Präparat die Morphologie der Zellen und das Auftreten von leuchtend blauen Stellen begutachtet. Außerdem wurden die Wirkung der vorherigen Inkubation der Zellen mit dem Enzym Hyaluronidase beurteilt.

### 2.2.5 Fotodokumentation

Bei allen Zellkulturen wurden Wachstum, Morphologie der Zellen und deren Veränderungen im Laufe der Passagen mikroskopisch beobachtet und mit der Foto-Kamera dokumentiert. So konnten typische morphologische Kriterien sowie Wachstumsmuster und -geschwindigkeit der Zelltypen miteinander verglichen werden.

Bei den drei verschiedenen porkinen Zelltypen wurden die Zellkulturen im Verlauf von der Primärkultur bis zur Passage 3 beobachtet. Bei den zwei humanen Zelltypen, Hyalozyten und RPE-Zellen, wurden bei den Versuchen zum Teil nach Präparation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene und für die Versuche aufgetaute Zellen verwendet, teils handelte es sich um nach Präparation direkt weiter kultivierte Zellen. Die Zellen wurden nach dem Auftauen in der Passage 3 in ihrem Wachstum miteinander verglichen, beobachtet und fotodokumentiert. Da in der experimentellen Phase dieser Arbeit keine weiteren Augen von menschlichen Spendern zur Präparation zur Verfügung standen, konnte hier keine Dokumentation des Zellkulturverlaufs bereits ab der Primärkultur erfolgen.

Auch die Präparate aus den immunhistochemischen Markierungen und Alcianblau-Färbungen wurden wenige Tage nach Versuchsdurchführung fotografiert. Dabei wurden sowohl die für die jeweiligen Zellen typischen Färbeverhalten und Markierungsmuster als auch Besonderheiten einzelner Präparate dokumentiert. Danach wurden die Präparate lichtgeschützt in einem Präparatekasten aufbewahrt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Zellkulturverlauf

Im Folgenden werden die bei der Kultivierung der einzelnen Zelltypen beobachteten Charakteristika bezüglich der Zellmorphologie und des spezifischen Wachstumsverhaltens im Laufe der Passagen dargestellt.

Nachdem die in dieser Arbeit verwendeten porkinen Zellkulturen durch eigene Präparation der Schweinebulbi gewonnen wurden, konnten diese Zellen von der Primärkultur (PK) bis zur Passage 3 (P3) beobachtet werden.

Bei den humanen Zellkulturen, die für die Experimente der immunhistochemischen Markierungen verwendet worden waren, handelte es sich zum einen Teil um Zellen, die direkt nach der Präparation bis zur P3 weiterkultiviert worden waren und zum anderen Teil um aufgetaute Zellen. Nachdem in diesem Fall nicht wie bei den porkinen Zellkulturen exakte Beobachtungen zum Verlauf der Zellkulturen bis zur P3 gemacht werden konnten, sollen für die humanen Zellkulturen nur Wachstumsverhalten und Eigenschaften der Zellen für die P3 beschrieben werden.

##### 3.1.1 Hyalozyten

###### 3.1.1.1 Porkine Hyalozyten

Die durch unter 2.2.1.1 beschriebene Präparation gewonnenen Hyalozyten wurden zum weiteren Wachstum zusammen mit Nährmedium in Kulturflaschen oder auf Glasplättchen in 12-well-Platten gegeben.

Zu Beginn der PK zeigten sich die Hyalozyten gleichmäßig verteilt auf dem Boden der Kulturflaschen beziehungsweise auf den Glasplättchen. In diesem frühen Stadium stellten sich die kleinen Zellen in kugelige Form mit reichlich Zytoplasma um den Zellkern dar (vgl. Abb. 3.1 a).

Grundsätzlich erfolgte erst nach dem Anwachsen einer größeren Menge von Zellen das erste Mal ein Wechsel des Mediums. Nach der Adhäsion der Hyalozyten auf dem Flaschenboden beziehungsweise auf den Glasplättchen wurde die Vermehrung der Zellen sichtbar. Die zu Beginn noch kugelige Form der Zellen veränderte sich in eine längliche Form, die Hyalozyten entwickelten Zellausläufer und nahmen insgesamt an Größe zu (vgl. Abb. 3.1 b).

Durch Teilung und das Zusammenwachsen benachbarter Zellen bildeten sich so nach der ersten Adhäsion mehrere Zellrasen mit hoher Zelldichte. Dabei stellte sich das konfluente Wachstum der

dünnen, länglichen Zellen typischerweise 'fischzug-artig' dar (vgl. Abb. 3.1 d). Die Zellen wiesen intrazytoplasmatische Granula auf (vgl. Abb. 3.1 c). Während bei den in Zellkulturflaschen wachsenden Hyalozyten das Wachstum kontinuierlich fortschritt, bis der komplette Flaschenboden bedeckt war, verlangsamte sich das Zellwachstum auf den Glasplättchen häufig, so dass sich die einzelnen entstandenen Zellgruppen kaum mehr vergrößerten.

In der P1 zeigten sich die einzelnen Hyalozyten bereits nach wenigen Stunden gleichmäßig verteilt auf dem Flaschenboden angewachsen. Verglichen mit der PK lagen nur wenige Zellen in der kugeligen Form vor, die meisten der Hyalozyten hatten schon in diesem frühen Stadium mehrere Zellausläufer (vgl. Abb. 3.1 b). Die Zellen zeigten nach rascher Vermehrung die bereits beobachtete Tendenz zum länglichen Wachstum (vgl. Abb. 3.1 c). Nach Erreichen des konfluenten Wachstums konnten die Hyalozyten in die nächste Passage überführt werden.

Auch in P2 und P3 zeigte sich wiederum ein sehr schnelles Anwachsen der Zellen. Der Großteil der Hyalozyten wies bereits zu diesem Zeitpunkt eine längliche Zellform mit mehreren Ausläufern auf (vgl. Abb. 3.1 b).

Ab der P2 konnte das typische 'fischzug-artige' Wachstum der Zellen (vgl. Abb. 3.1 d) auf mehreren Ebenen beobachtet werden.

Die Grafik 3.1 gibt einen Überblick über die durchschnittlichen Kultivierungszeiten der porkinen Hyalozytenkulturen in den einzelnen Passagen bis zum konfluenten Wachstum.

Die Abbildungen 3.1 a-d zeigen den Wachstumsverlauf der porkinen Hyalozyten.

Grafik 3.1 : Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Hyalozyten in den einzelnen Passagen

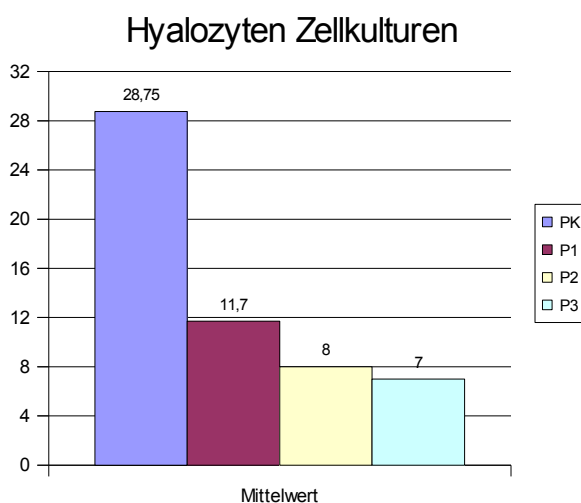
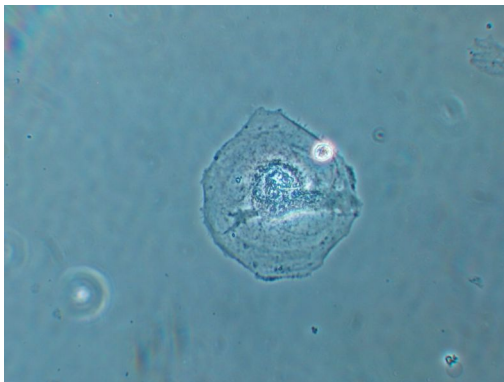
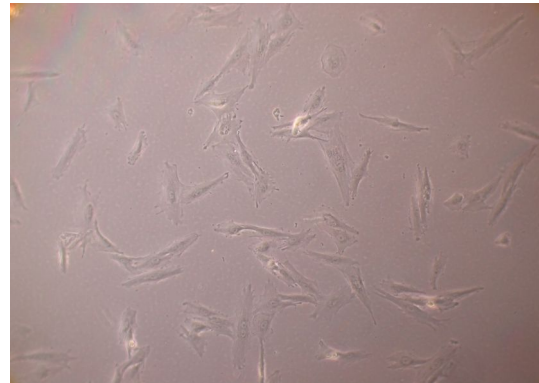
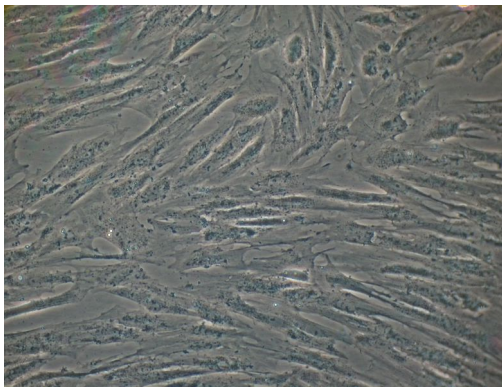


Abb. 3.1 : Wachstum der porkinen Hyalozyten

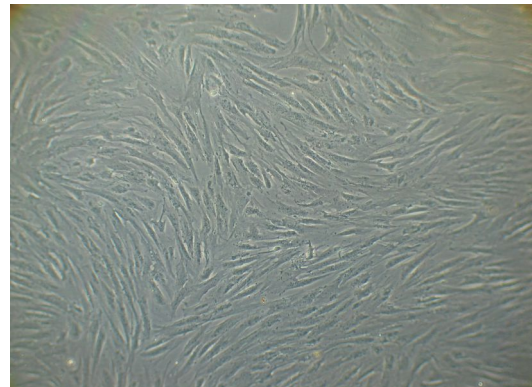
a)



b)



c)



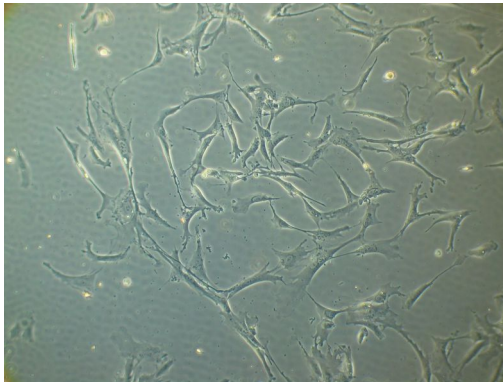
d)

- a) Porkiner Hyalozyt (PK): Einzelzelle nach Anwachsen auf dem Boden der Zellkulturflasche (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 5,7)
- b) Porkine Hyalozyten (P1): Formveränderung der Zellen nach Anwachsen auf dem Boden der Zellkulturflasche in die längliche Form, Ausbildung von Zellausläufern (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- c) Porkine Hyalozyten (P1): Zellen im dichten Wachstum, längliche Zellkörper, intrazytoplasmatische Granula deutlich zu erkennen (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- d) Porkine Hyalozyten (P2): konfluentes Wachstum der Zellen, 'fischzug-artig' (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)

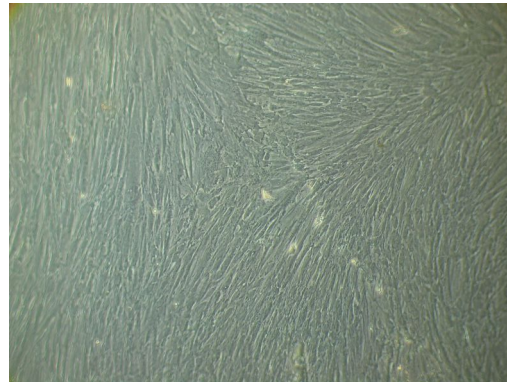
## 3.1.1.2 Humane Hyalozyten

Nach dem Auftauen (siehe 2.2.1.7) zeigten sich die humanen Hyalozyten gleichmäßig auf den Glasplättchen verteilt. Der Großteil der Zellen wies zu diesem Zeitpunkt einen länglichen Zellkörper auf (vgl. Abb. 3.2 a). Es zeigten sich von Beginn der Kultivierung an intrazytoplasmatische Granula. Bei konfluentem Wachstum zeigten die Zellen das bereits für die porkinen Hyalozyten beschriebene 'fischzug-artige' Wachstum (vgl. Abb. 3.2 b).

Die Abbildungen 3.2 a und b zeigen das Wachstum der humanen Hyalozyten der Passage 3.

**Abb. 3.2: Wachstum der humanen Hyalozyten**

a)



b)

- a) Humane Hyalozyten (P3): Zellen nach dem Anwachsen, längliche Zellkörper  
(Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)**  
**b) Humane Hyalozyten (P3): konfluentes, 'fischzug-artiges' Wachstum  
(Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)**

**3.1.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels****3.1.2.1 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels**

Die durch unter 2.2.1.3 beschriebene Präparation gewonnenen Gewebestücke des retinalen Pigmentepithels wurden zum weiteren Wachstum zusammen mit dem Nährmedium in Kulturflaschen oder auf Glasplättchen in 12-well-Platten gegeben.

Zu Beginn der PK ging das erste Wachstum der RPE-Zellen konzentrisch von den Gewebestücken aus. Die Zellen wiesen typischerweise eine runde bis hexagonale Form auf und zeigten sich dicht nebeneinander angeordnet mit deutlich sichtbaren Zell-Zwischenräumen (vgl. Abb. 3.3 a).

Dieses Wachstumsmuster erinnerte an die klassische Anordnung von Pflastersteinen. An zahlreichen Stellen gleichzeitig breiteten sich die RPE-Zellen von diesen pigmentierten Gewebeanteilen ausgehend aus. Vor allem bei einzeln wachsenden Zellen und kleineren Zellgruppen konnte jedoch ein Abweichen von der typisch runden Form beobachtet werden. Hier wiesen die Zellen ein längliches Wachstum auf, die Zellen traten durch Ausläufer miteinander in Kontakt (vgl. Abb. 3.3 b). Circa 20-30% der Zellen wiesen gut sichtbares bräunlich schwarzes Pigment im Zytoplasma auf (vgl. Abb. 3.3 b).

Bereits mit dem ersten Wechsel des Nährmediums wurden die Pigmentpartikel, von denen das Wachstum der Zellen ausgegangen war, fortgespült, was jedoch keinen sichtbaren Einfluss auf das weitere Wachstum der Zellen hatte. So zeigte sich das Wachstumsmuster der Zellen nach der

Ausbreitung auf den gesamten Flaschenboden beziehungsweise auf die Glasplättchen zum großen Teil im oben beschriebenen typischen 'Pflasterstein-Muster' mit runder bis hexagonaler Zellform, nur an manchen Stellen zeigte sich die Form der Zellen länglich mit nicht mehr scharf voneinander zu trennenden Zellgrenzen (vgl. Abb. 3.3 c).

In der P1 war nach der Trypsinierung ein großer Teil der Zellen adhärent in Gruppen von 5-10 Zellen, die übrigen RPE-Zellen lagen als Einzelzellen vor. Die meisten der Zellen zeigten den bereits bei den Zellen der PK beschriebenen rundlichen Zellkörper (vgl. Abb. 3.3 a).

Mit circa 10% zeigte ein geringerer Anteil der RPE-Zellen sichtbares Pigment im Zytoplasma. Nach vollständigem Bewachsen des Flaschenbodens stellte sich das Wachstum der Zellen so dar, dass man das typische 'pflasterstein-artige' Wachstum und ein längliches Wachstum nebeneinander vorfand (vgl. Abb. 3.3 c).

In den folgenden Passagen verringerte sich der Anteil der RPE-Zellen mit sichtbarem bräunlich schwarzen Pigment weiter, bis in P3 kein Pigment mehr in den Zellen zu sehen war (vgl. Abb. 3.3 d). Grundsätzlich entsprach das Wachstumsmuster dem bereits für die vorhergehenden Passagen beschriebenen. Jedoch zeigte nur noch ein geringer Anteil der Zellen die regelmäßige 'pflasterstein-artige' Anordnung der hexagonalen Zellkörper, wie sie vor allem in der PK beobachtet wurde. In P2 und P3 war in weiten Teilen ein Wachstum mit länglicher Morphologie der Zellen zu sehen (vgl. Abb. 3.3 d).

Die Grafik 3.2 gibt einen Überblick über die durchschnittlichen Kultivierungszeiten der porkinen RPE-Zellkulturen in den einzelnen Passagen bis zum konfluenten Wachstum. Die Abbildungen 3.3 a-d zeigen den Wachstumsverlauf der porkinen RPE-Zellen.

*Grafik 3.2* : Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Zellen des retinalen Pigmentepithels in den einzelnen Passagen

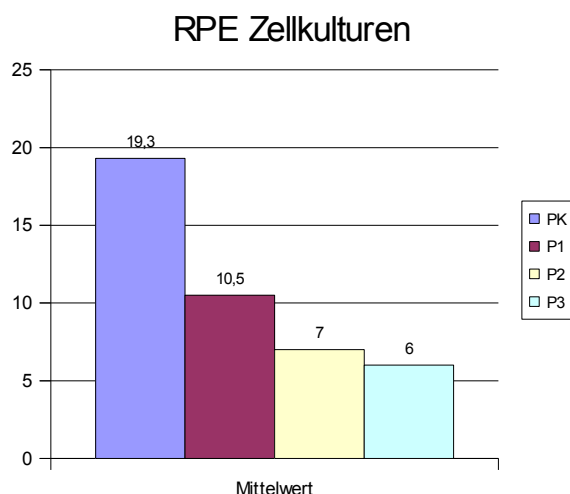
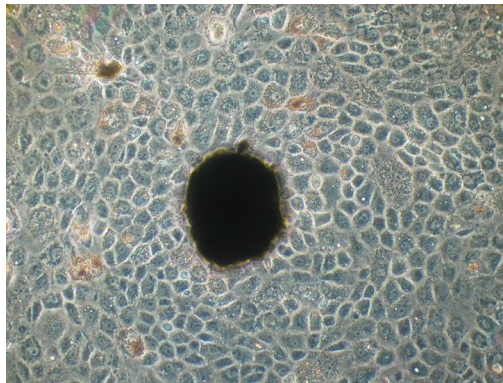
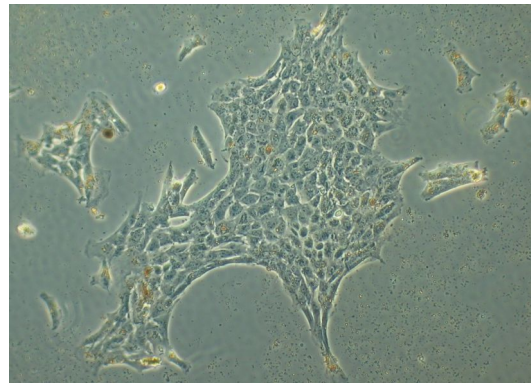


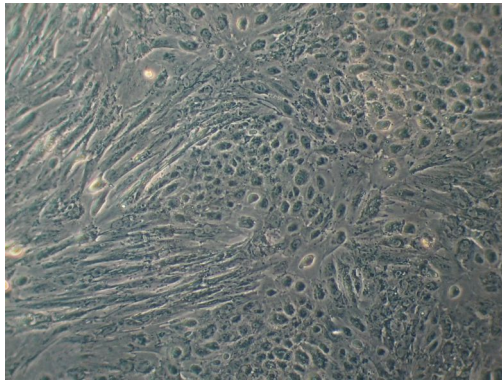


Abb. 3.3: Wachstum der porkinen RPE-Zellen

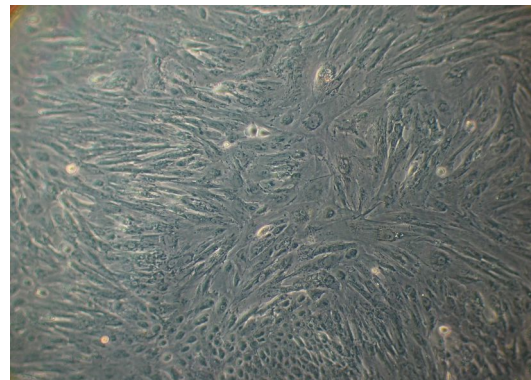
a)



b)



c)



d)

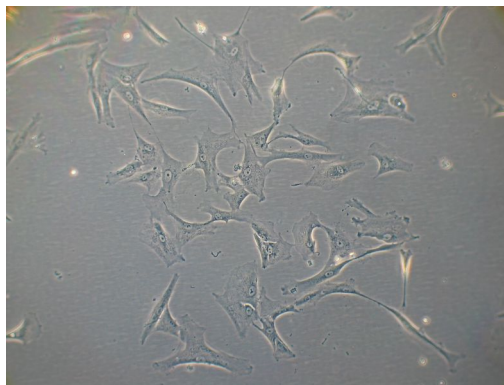
- a) Porkine RPE-Zellen (PK): Wachstum der Zellen konzentrisch vom Gewebe ausgehend, 'pflasterstein-artig' (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- b) Porkine RPE-Zellen (PK): längliches Wachstum der Zellen im Randbereich, deutlich sichtbares Pigment (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)
- c) Porkine RPE-Zellen (P1): Zellen im dichten Wachstum, teils 'pflasterstein-artig', teils länglich (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)
- d) Porkine RPE-Zellen (P2): Zellen im dichten Wachstum, großteils längliche Zellform, kein sichtbares Pigment mehr vorhanden (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)

## 3.1.2.2 Humane Zellen des retinalen Pigmentepithels

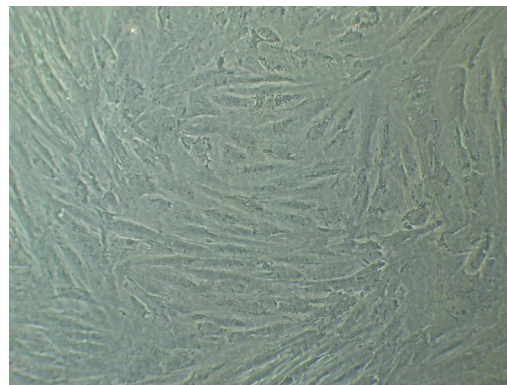
Die Zellen des humanen RPE zeigten zu Beginn der P3 das von uns bei den Kulturen der porkinen RPE-Zellen in P2 und P3 beschriebene Zellbild (siehe 3.1.2.1). Die rundlich ovalen Zellen waren regelmäßig auf dem Boden der Glasplättchen verteilt und zeigten nach dem Anwachsen Zellausläufer (vgl. Abb. 3.4 a). Dicht zusammenhängende Zellen, wie sie bei den porkinen RPE-Zellen nach der Trypsinierung beobachtet werden konnten, lagen nicht vor. In den Zellen waren intrazytoplasmatische Granula, jedoch keine sichtbaren Pigmentansammlungen mehr zu erkennen

(vgl. Abb. 3.4 a, b). Wie schon für die porkinen RPE-Zellen beschrieben, zeigte sich bei konfluentem Wachstum zum großen Teil ein längliches Wachstum der Zellen (vgl. Abb. 3.4 b). Die Abbildungen 3.4 a und b zeigen das Wachstum der humanen RPE-Zellen der Passage 3.

**Abb. 3.4: Wachstum der humanen RPE-Zellen**



*a)*



*b)*

- a) Humane RPE-Zellen (P3): Einzelzellen nach Anwachsen, Zellausläufer  
(Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)**
- b) Humane RPE-Zellen (P3): Zellen im konfluenten Wachstum  
(Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)**

### 3.1.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels

Die durch unter 2.2.1.2 beschriebene Präparation gewonnenen Zellen vom Epithel des Ziliarkörpers wurden zum weiteren Wachstum zusammen mit Nährmedium in Kulturflaschen oder auf Glasplättchen in 12-well-Platten gegeben.

Bereits nach wenigen Stunden zeigte sich eine Adhäsion der Zellen auf dem Flaschenboden beziehungsweise auf den Glasplättchen. Bei den Zellkulturen des Ziliarkörper-Epithels wurde bereits nach 24 Stunden der erste Mediumwechsel mit Spülung mit Penicillin/Streptomycin durchgeführt. Danach erfolgte der Mediumwechsel wie bei allen Zellkulturen regelmäßig zweimal pro Woche.

Bezüglich des Wachstums ließen sich verglichen mit den Kulturen der RPE-Zellen und Hyalozyten ganz eigene Charakteristika beobachten. Zu Beginn der Wachstumsperiode in der PK zeigten sich die Zellen einzeln oder in kleineren Grüppchen verteilt auf dem Flaschenboden. Ein Wachstum von Gewebestücken oder bereits adhärenente Zellen wie bei den porkinen RPE-Zellen wurden nicht beobachtet.

Die Zellform war variabel, ein Teil der Zellen war dünn und länglich (vgl. Abb. 3.5 a-d, e, g, h), wobei auch Zellen mit runder Form wie bei den PK der Hyalozyten sowie einzelne Zellen oder

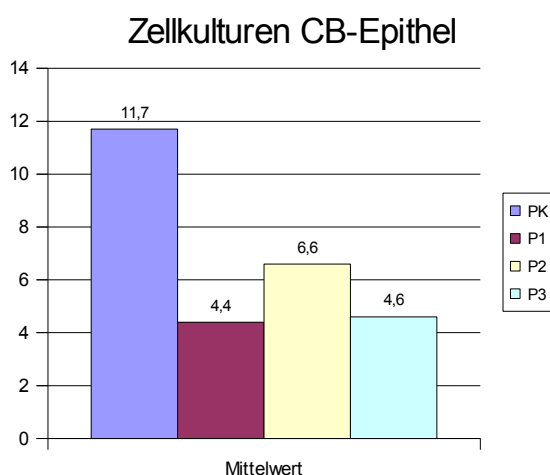
Zellgruppen, die an die hexagonale bis runde Form der RPE-Zellen erinnerten, zu sehen waren (vgl. Abb. 3.5 a, d, f, g, h). Circa 20% der Zellen wiesen intrazytoplasmatisches braunes Pigment auf (vgl. Abb. 3.5 c). Diese pigmenthaltigen Zellen unterschieden sich grundsätzlich morphologisch nicht von den umliegenden Zellen. So fanden sich pigmentierte Zellen sporadisch neben morphologisch gleichartigen nicht pigmentierten Zellen als auch Gruppen von fast ausschließlich pigmentierten Zellen. Wie bereits erwähnt konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Pigmentgehalt und Morphologie der Zelle erkannt werden. Einige wenige Zellen fielen durch einen im Vergleich zu den übrigen Zellen größeren rundlich oval geformten Zellkörper auf (vgl. Abb. 3.5 a, d, h). Oft fanden sich mehrere solcher Zellen nahe beieinander liegend.

Grundsätzlich ähnelte das längliche 'fibroblasten-artige' Wachstum in großen Teilen dem Wachstum der Hyalozyten (vgl. Abb. 3.5 i). In der PK erinnerten bestimmte konfluente Areale aber auch an das bei den Kulturen der RPE-Zellen beobachtete Wachstumsmuster mit runder Zellform (vgl. Abb. 3.5 f).

Die Eigenschaften der Zellen entsprachen in den weiteren Passagen den in der PK beobachteten, Zellmorphologie und Wachstumsmuster können für die Passagen 1 bis 3 gleichermaßen beschrieben werden. Lediglich der Anteil der pigmenthaltigen Zellen nahm bereits in P1 deutlich ab, in P3 war schließlich kein intrazytoplasmatisches Pigment mehr in den Zellen zu erkennen. Nach wie vor waren im homogenen Zellrasen die bereits beschriebenen Einzelzellen mit größerem Zellkörper zu sehen (vgl. Abb. 3.5 a, d, h).

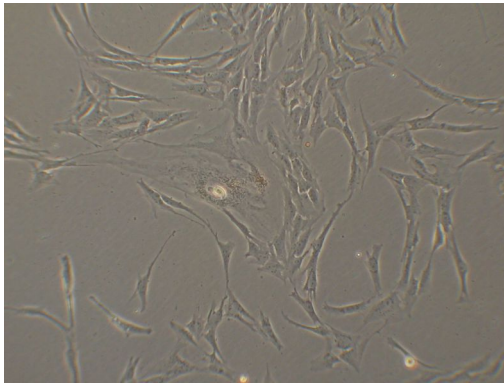
Die Grafik 3.3 gibt einen Überblick über die Kultivierungszeiten der porkinen Zellkulturen aus dem CB-Epithel in den einzelnen Passagen bis zum konfluenten Wachstum. Die Abbildungen 3.5 a-i zeigen den Wachstumsverlauf der porkinen Zellen des CB-Epithels.

*Grafik 3.3* : Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Zellen des Ziliarkörper-Epithels in den einzelnen Passagen

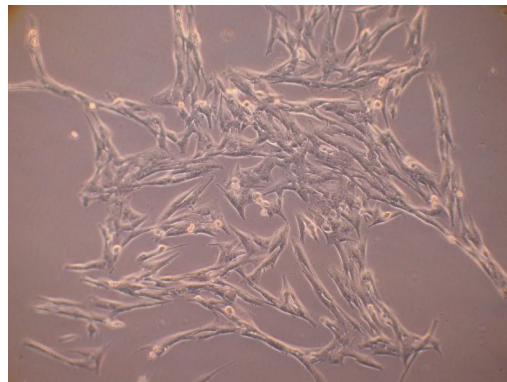




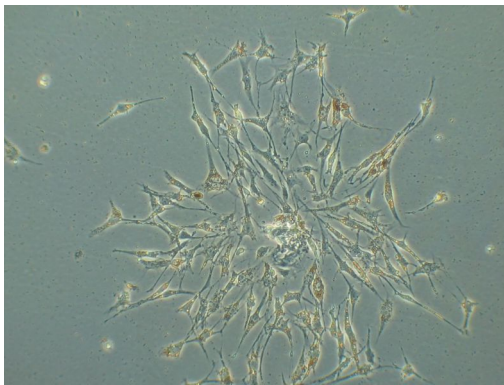
**Abb. 3.5: Wachstum der porkinen Zellen des Ziliarkörper-Epithels**



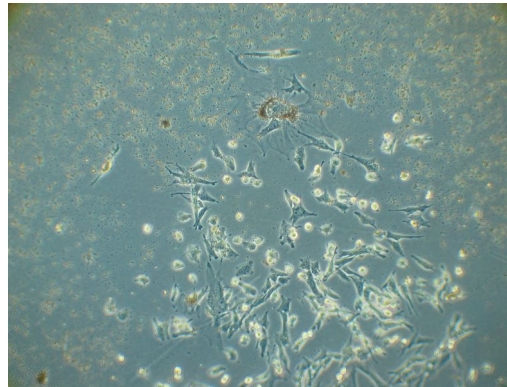
*a)*



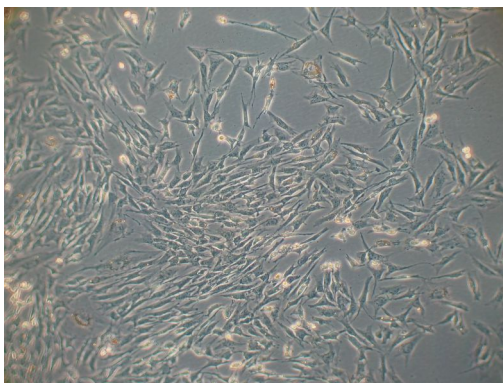
*b)*



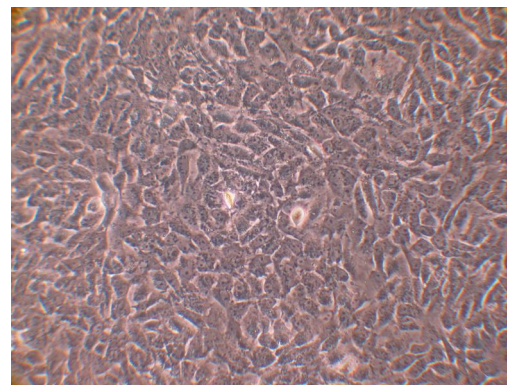
*c)*



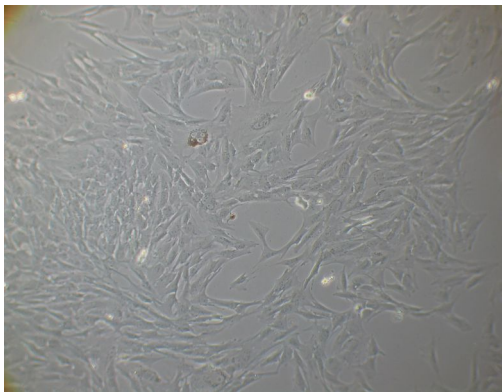
*d)*



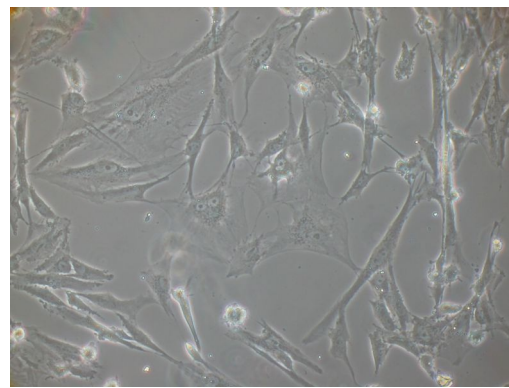
*e)*



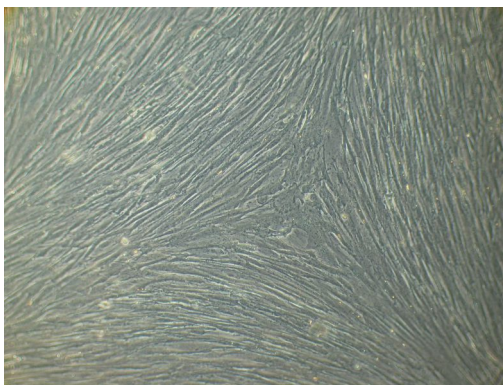
*f)*



g)



h)



i)

- a) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): große Einzelzelle mit rund-ovalem Zellkörper, umgeben von länglichen Zellen (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)
- b) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): typisches Wachstumsmuster nach Adhäsion (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- c) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): dichter Zellrasen länglicher Zellen, deutlich pigmenthaltig (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)
- d) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Zellen wenige Stunden nach Präparation, große, ovale Einzelzelle, pigmenthaltig, umgeben von länglichen Zellen (Vergrößerung 10-fach, ohne Zoom)
- e) Porkine Zellen des CB-Epithels (P2): dichtes Wachstum, längliche Einzelzellen (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- f) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): dichtes Wachstum, runder Zellkörper (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- g) Porkine Zellen des CB-Epithels (P1): dichtes Wachstum länglicher Zellen, Pigmentgehalt deutlich abnehmend (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- h) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): dichtes Wachstum länglicher Zellen, große Einzelzelle, kein intrazelluläres Pigment (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)
- i) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): konfluentes, längliches Wachstum (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)

## 3.2 Immunhistochemische Markierungen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen dargestellt. Nach einer kurzen Erläuterung der für alle Markierungen gültigen Resultate bezüglich der Qualität der Präparate nach Versuchsdurchführung und der durchgeführten Positiv- und Negativkontrollen, folgt die Darstellung der Ergebnisse der Präparate in den Versuchsgruppen I und II.

### 3.2.1 Allgemeine Ergebnisse

#### 3.2.1.1 Qualität der Präparate

Nach Durchführung der immunhistochemischen Markierungen wie unter 2.2.3.1.2 beschrieben lag dieselbe Verteilung der Zellen wie vor dem Färbevorgang auf den Glasplättchen vor. Auch Form und Größe der Zellen waren unverändert und durch die Färbung mit Mayer's Hämatoxylin deutlich zu erkennen, so dass man auf den Präparaten das typische Wachstum für den jeweiligen Zelltyp in der entsprechenden Passage gut erkennen konnte.

Auch bei den Paraffinschnitten des Auges war das Gewebe durch die Färbung gut zu erkennen und hatte durch den Vorgang der Immunmarkierung keine sichtbaren Schädigungen oder Veränderungen erfahren. So ließen sich die Schnitte mit dem Ziliarkörper und dem angrenzenden Gewebe gut beurteilen.

Bei den auf Objektträger gezogenen Glaskörpern waren durch die Färbung die Zellkörper der Hyalozyten, die in besonders dichter Anordnung in der Äquatorialebene des GK angesiedelt sind, deutlich zu sehen. Die GK-Matrix erschien zum größten Teil farblos oder zeichnete sich durch eine schwach blaue Anfärbung aus.

#### 3.2.1.2 Positivkontrollen

Grundsätzlich wurden in der Versuchsgruppe I als Referenz zur Beurteilung der Funktionsfähigkeit der Antikörper und zur Kontrolle der korrekten Durchführung der Methodik jeweils Positivkontrollen durchgeführt (siehe 2.2.4.1.1). Dazu wurden Paraffinschnitte humaner Tonsillen mit den einzelnen Antikörpern inkubiert. Für die verwendeten Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 zeigte sich eine deutliche Markierung der Zellen auf den Präparaten (vgl. Abb. 3.6 a-c).

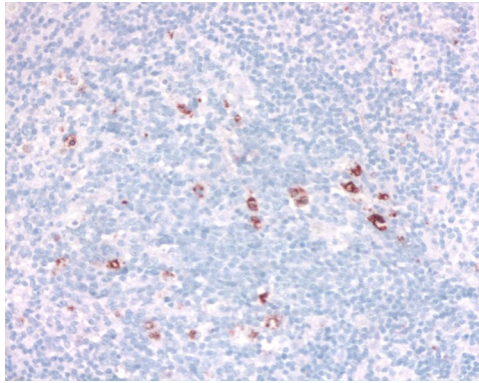
In der Versuchsgruppe II stand keine Positivkontrolle zur Verfügung, da es sich um die erstmalige



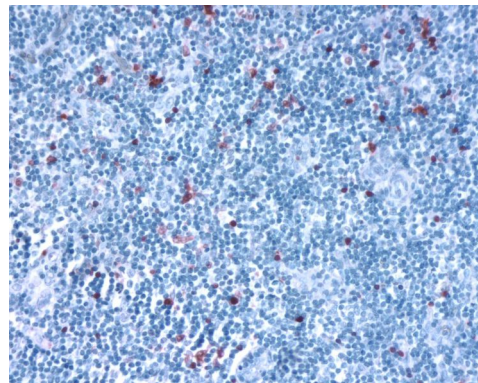
Testung zweier eigens für unsere Versuche hergestellter Antikörper handelte.

Die Abbildungen 3.6 a-c zeigen die Positivkontrollen für die Antikörper der Versuchsgruppe I.

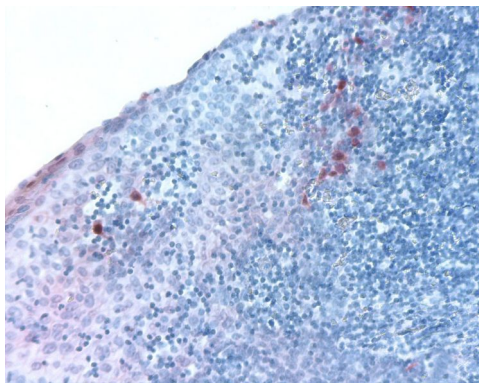
**Abb. 3.6: Versuchsgruppe I: Positivkontrollen**



a)



b)

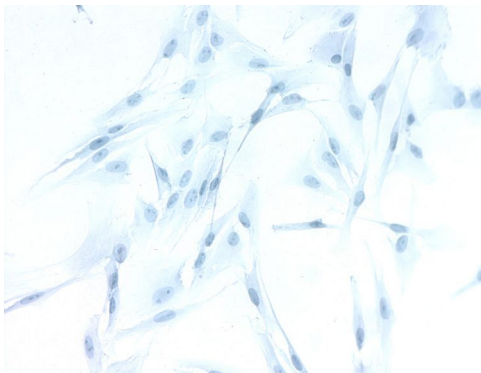


c)

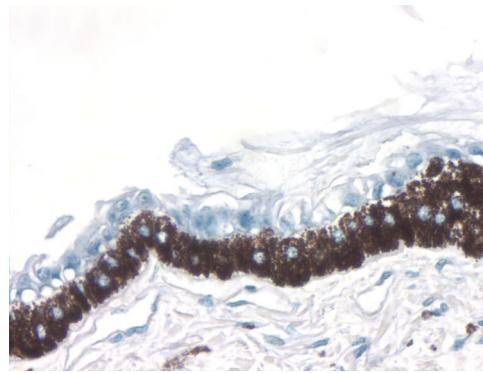
- a) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)
- b) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)
- c) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)

### 3.2.1.3 Negativkontrollen

Bei allen in die Auswertung aufgenommenen Präparaten waren gültige Negativkontrollen vorhanden (siehe 2.2.4.1.1). Bei diesen waren die Zellen und Gewebestrukturen durch die Hämatoxylin-Färbung gut zu erkennen, während eine durch eine positive Reaktion mit einem Antikörper entstandene rote Färbung an den Zellstrukturen nicht nachzuweisen war (vgl. Abb. 3.7 a, b).

Abb. 3.7: Versuchsgruppe I und II: Negativkontrollen

a)



b)

a) Negativkontrolle: Porkine Hyalozyten (P3) (Vergrößerung 20-fach)

b) Negativkontrolle: Paraffinschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper-Epithel (Vergrößerung 40-fach)

3.2.2 Versuchsgruppe I: Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen der unter 2.2.4.1.1 aufgelisteten Präparate mit den Antikörpern Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 dargestellt.

Die Tabellen 3.1 bis 3.4 zeigen die jeweiligen Ergebnisse für die porkinen und humanen Zellkulturen und Gewebsschnitte der Versuchsgruppe I im Überblick.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Zellkulturen in Versuchsgruppe I

	<i>Anti-CD-68</i>	<i>Anti-S-100</i>	<i>Anti-S-100-A2</i>
<b>Porkine Hyalozyten</b>			
PK	-	II	IV
P3	-	II	V
<b>Porkine RPE-Zellen</b>			
PK	-	-	IV
P3	-	-	V
<b>Porkine Zellen des CB-Epithels</b>			
PK	-	I	II
P3	-	I	II

*Tabelle 3.2:* Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Paraffinpräparaten in Versuchsgruppe I

	<i>Anti-CD-68</i>	<i>Anti-S-100</i>	<i>Anti-S-100-A2</i>
<b>Gewebsschnitte porkines Auge</b>			
CB-Epithel	-	-	-
Hyalozyten	-	-	-
<b>Porkiner Glaskörper auf Objektträger</b>			
Hyalozyten	-	-	-

*Tabelle 3.3:* Ergebnisse der Immunmarkierungen an den humanen Zellkulturen in Versuchsgruppe I

	<i>Anti-CD-68</i>	<i>Anti-S-100</i>	<i>Anti-S-100-A2</i>
<b>Humane Hyalozyten P3</b>			
Durchgehend kultiviert	-	<b>IV</b>	
Aufgetaut	-	-	-
<b>Humane RPE-Zellen P3</b>			
Durchgehend kultiviert	<b>V</b>	-	
Aufgetaut	<b>V</b>	-	-

*Tabelle 3.4:* Ergebnisse der Immunmarkierungen an den humanen Gewebsschnitten in Versuchsgruppe I

	<i>Anti-CD-68</i>	<i>Anti-S-100</i>	<i>Anti-S-100-A2</i>
<b>Gewebsschnitte humanes Auge</b>			
CB-Epithel	-	<b>+</b>	-

### 3.2.2.1 Hyalozyten

#### 3.2.2.1.1 Porkine Hyalozyten

Bei den porkinen Hyalozyten-Kulturen waren in Versuchsgruppe I bei Testung der Antikörper Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 eindeutig positive Markierungen nachzuweisen, während sich bei Verwendung des Antikörpers Anti-CD-68 keine Anfärbung der Zellen zeigte.

Bei Anwendung von Anti-S-100 zeigten sich für die Zellen aus PK und P3 jeweils Markierungen Grad II (vgl. Abb. 3.8 a, b). Die Färbungen betrafen teils einzelne Zellen, teils größere Areale von konfluent wachsenden Zellen. Der markierte Zelltypus unterschied sich in diesem Fall in Form und Größe nicht von den nicht angefärbten Zellen.

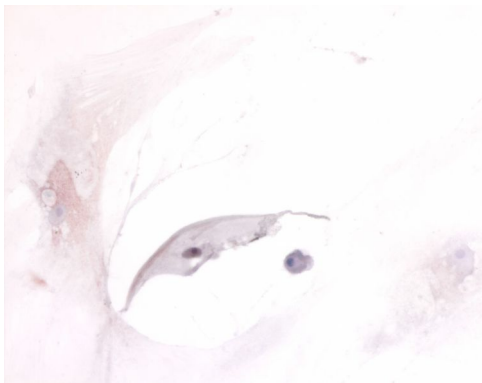
Bei den Immunmarkierungen mit Anti-S-100-A2 waren bei den Hyalozyten der PK Anfärbungen Grad IV, bei Zellen der P3 Markierungen Grad V zu sehen (vgl. Abb. 3.8 c, d). Die Verteilung dieser markierten Zellen war gleichmäßig, ein Nebeneinander von unmarkierten und kräftig markierten Zellen konnte beobachtet werden.

Verglichen mit den Markierungen der Hyalozyten mit dem Antikörper Anti-S-100 war bei Verwendung von Anti-S-100-A2 ein größerer Anteil der Zellen angefärbt und die Markierung fiel außerdem kräftiger aus.

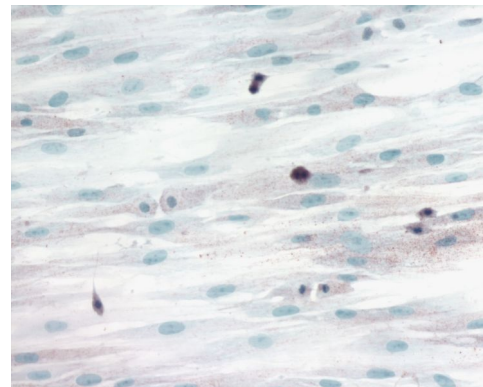
Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Immunmarkierungen mit dem Antikörper Anti-CD-68 an den porkinen Hyalozyten weder in PK noch bei den Zellkulturen der P3 eine sichtbare Markierung der Zellen.

Die Abbildungen 3.8 a-e zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen Hyalozyten in Versuchsgruppe I.

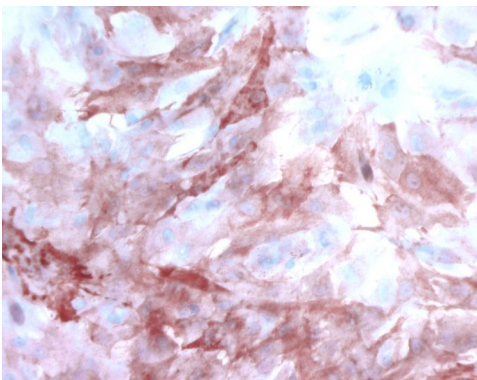
**Abb. 3.8: Versuchsgruppe I: Zellkulturen porkine Hyalozyten**



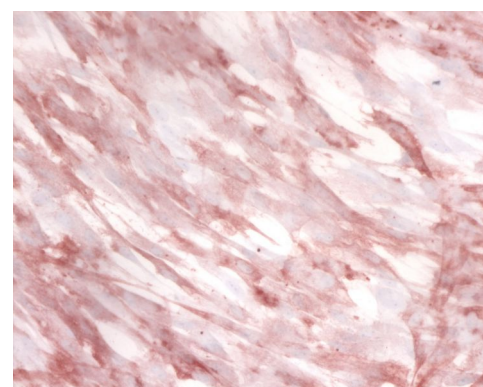
**a)**



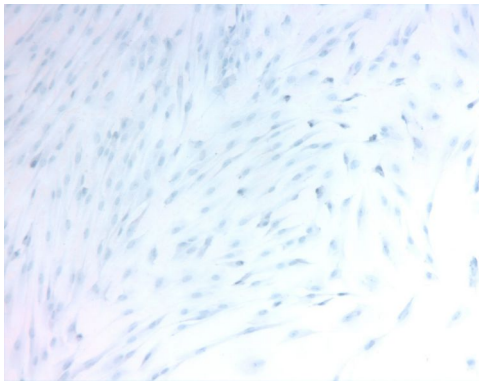
**b)**



**c)**



**d)**



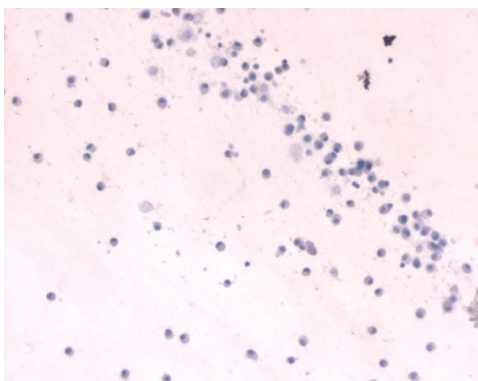
e)

- a) Porkine Hyalozyten (PK): Mark. Grad II mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 40-fach)
- b) Porkine Hyalozyten (P3): Mark. Grad II mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)
- c) Porkine Hyalozyten (PK): Mark. Grad IV mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)
- d) Porkine Hyalozyten (P3): Mark. Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)
- e) Porkine Hyalozyten (P3): Keine Mark. mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 10-fach)

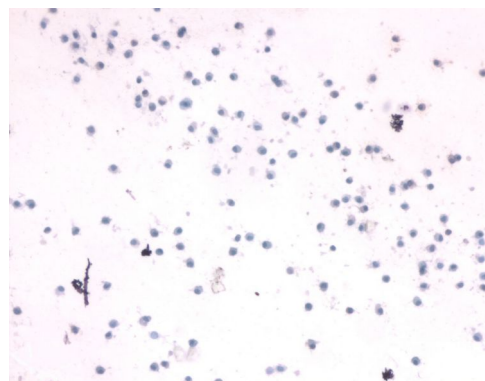
#### 3.2.2.1.2 Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten

Mit keinem der getesteten Antikörper der Versuchsgruppe I gelang die Markierung der der GK-Matrix anliegenden Hyalozyten (vgl. Abb. 3.9 a-c). Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei den mit Hyaluronidase inkubierten Präparaten (siehe 2.2.3.1.1). So wurden die Hyalozyten auf porkinem GK für die Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 als negativ gewertet. Die Abbildungen 3.9 a-c zeigen die Resultate der Immunmarkierungen der porkinen GK mit Hyalozyten in Versuchsgruppe I.

**Abb. 3.9: Versuchsgruppe I: porkiner Glaskörper mit Hyalozyten**

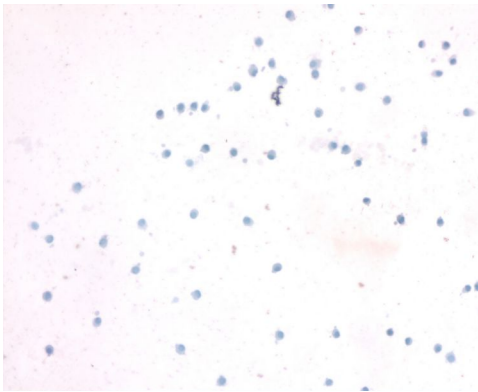


a)



b)





c)

- a) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68  
(Vergrößerung 20-fach)
- b) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100  
(Vergrößerung 20-fach)
- c) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2  
(Vergrößerung 20-fach)

#### 3.2.2.1.3 Humane Hyalozyten

In der Versuchsgruppe I ließen sich an den humanen Hyalozyten nur bei Verwendung des Antikörpers Anti-S-100 positive Reaktionen zeigen.

Hierbei muss erwähnt werden, dass sich für den Antikörper Anti-S-100 bei den einzelnen Wiederholungsversuchen unterschiedliche Ergebnisse zeigten.

So fanden sich bei den ersten beiden Wiederholungsversuchen mit humanen Hyalozyten, die direkt nach Präparation bis zur Passage 3 weiterkultiviert worden waren, Markierungen Grad IV (vgl. Abb. 3.10 a, b). Es war eine regelmäßige Verteilung der gefärbten Zellen auf den Präparaten sichtbar. Der markierte Zelltypus unterschied sich dabei in Form und Größe nicht von dem nicht markierten.

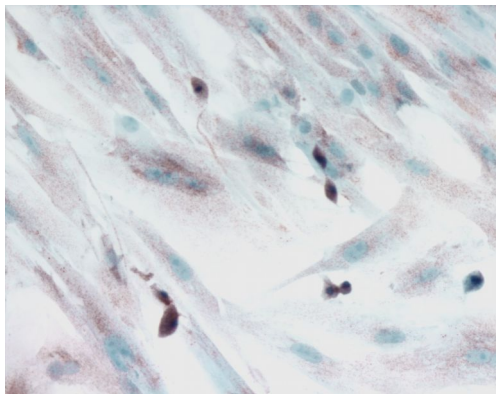
Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen mussten die drei weiteren Wiederholungsversuche mit dem Antikörper Anti-S-100, bei denen nach Präparation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene und hierauf aufgetaute humane Hyalozyten verwendet worden waren, als negativ gewertet werden. Bei ansonsten identischen Versuchsbedingungen wurden hier keine markierten Zellen auf den Objektträgern gefunden (vgl. Abb. 3.10 c). Somit konnte nur für einen Teil der in den Versuchen verwendeten humanen Hyalozyten die positive Markierung mit dem Antikörper Anti-S-100 gezeigt werden.

Bei der Durchführung der Immunmarkierungen der humanen Hyalozytenkulturen mit dem Antikörper Anti-CD-68 zeigten sich in allen Wiederholungsversuchen eindeutig negative Ergebnisse. Keine der auf dem Präparat befindlichen Zellen zeigte eine rote Markierung.

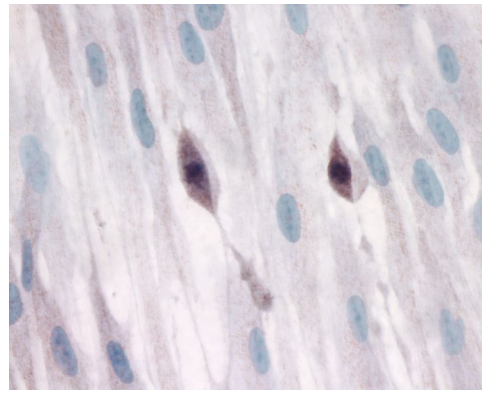
Für den Antikörper Anti-S-100-A2 bestätigte sich – im Gegensatz zu den porcinen Zellkulturen, die allesamt Markierungen mit Anti-S-100-A2 aufwiesen – bei den Wiederholungsversuchen für die humanen Hyalozyten die fehlende Reaktivität mit diesem Antikörper. In diesen Versuchen wurden ausschließlich aufgetaute Zellen verwendet.

Die Abbildungen 3.10 a-e zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an humanen Hyalozyten in Versuchsgruppe I.

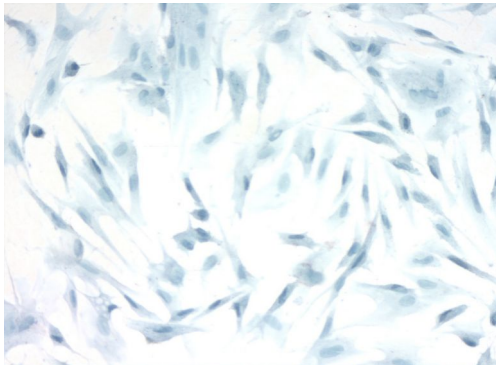
**Abb. 3.10: Versuchsgruppe I: Zellkulturen humane Hyalozyten**



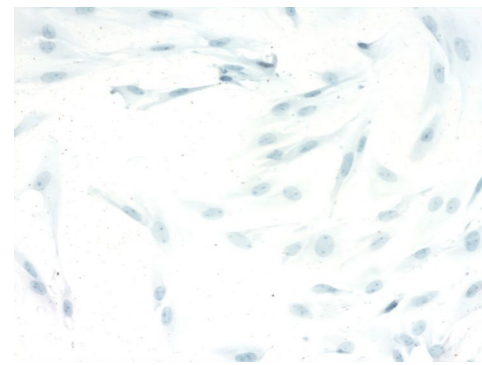
*a)*



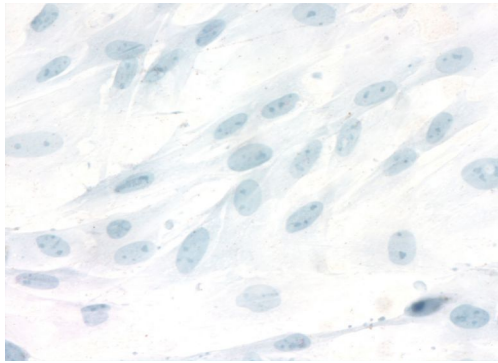
*b)*



*c)*



*d)*



e)

- a) **Humane Hyalozyten (P3): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)**
- b) **Humane Hyalozyten (P3): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)**
- c) **Humane Hyalozyten (P3-aufgetaute Zellen): keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)**
- d) **Humane Hyalozyten (P3-aufgetaute Zellen): keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 10-fach)**
- e) **Humane Hyalozyten (P3): keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)**

### 3.2.2.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels

#### 3.2.2.2.1 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels

Die Zellen, die aus dem retinalen Pigmentepithel von Schweineaugen gewonnen worden waren (siehe 2.2.1.3), zeigten Markierungen bei Testung des Antikörpers Anti-S-100-A2, während keine Reaktivität mit den Antikörpern Anti-CD-68 und Anti-S-100 gezeigt werden konnte.

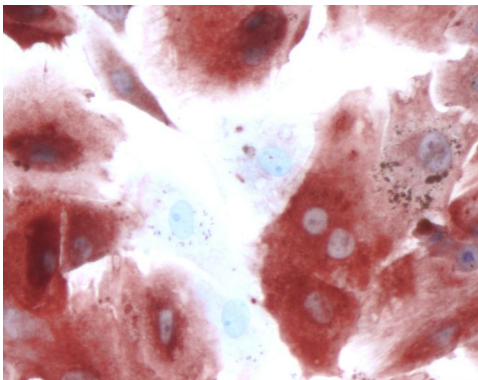
Bei Verwendung des AK Anti-S-100-A2 waren bezüglich des Anteils der markierten Zellen auf den Präparaten die Ergebnisse mit denen der Markierungen der porkinen Hyalozyten-Kulturen mit diesem AK vergleichbar (siehe 3.2.2.1.1): es konnte bei den RPE-Zellen der PK eine Markierung Grad IV beobachtet werden (vgl. Abb. 3.11 a), in der Passage 3 eine Markierung Grad V (vgl. Abb. 3.11 b, c). Morphologisch waren keine Unterschiede zwischen den angefärbten und nicht angefärbten Zellen festzustellen. Die Verteilung der markierten Zellen war gleichmäßig, die Intensität der Anfärbungen variierte leicht, wobei nicht angefärbte Zellen zwischen kräftig markierten zu finden waren (vgl. Abb. 3.11 a).

Im Gegensatz zu den porkinen Hyalozyten-Kulturen zeigten die porkinen RPE-Zellen weder in PK noch in P3 Reaktivität mit dem AK Anti-S-100 (vgl. Abb. 3.11 d, e).

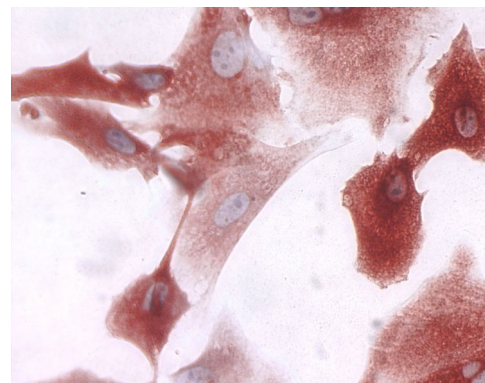
Auch für den AK Anti-CD-68 konnten weder in PK noch in P3 Markierungen der porkinen Zellen des RPE nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.11 f, g).

Die Abbildungen 3.11 a-g zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen RPE-Zellen in Versuchsgruppe I.

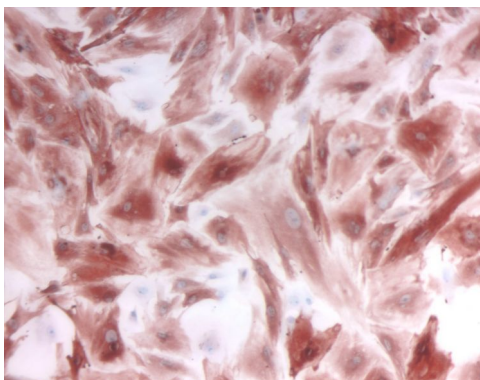
**Abb. 3.11: Versuchsgruppe I: Kulturen porkine RPE-Zellen**



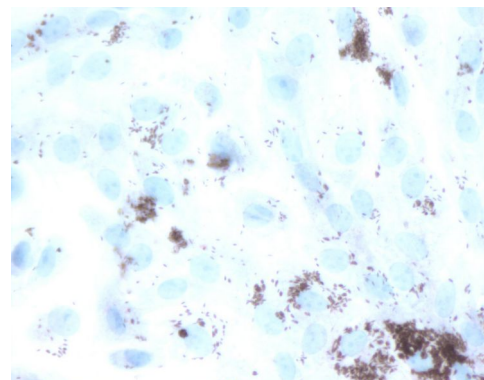
a)



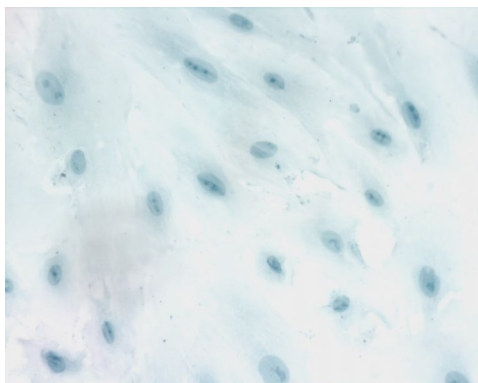
b)



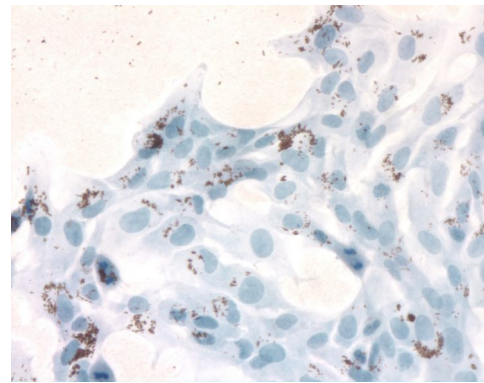
c)



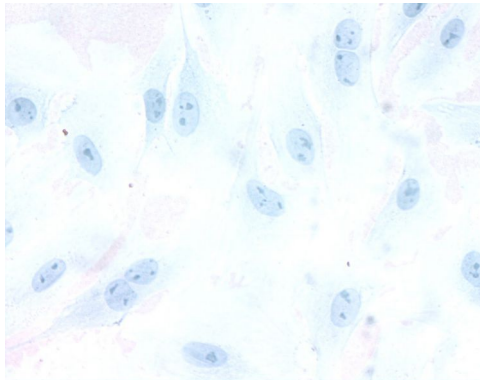
d)



e)



f)



g)

- a) **Porkine RPE-Zellen (PK): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergrößerung 40-fach)**
- b) **Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 40-fach)**
- c) **Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 10-fach)**
- d) **Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 40-fach)**
- e) **Porkine RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)**
- f) **Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 40-fach)**
- g) **Porkine RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 40-fach)**

#### 3.2.2.2.2 Humane Zellen des retinalen Pigmentepithels

Bei der immunhistochemischen Charakterisierung der humanen RPE-Zellen in Versuchsgruppe I zeigten sich typische Besonderheiten.

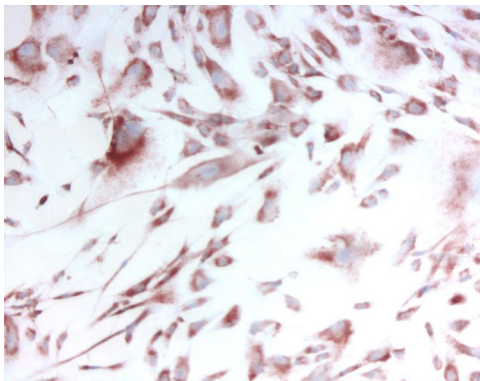
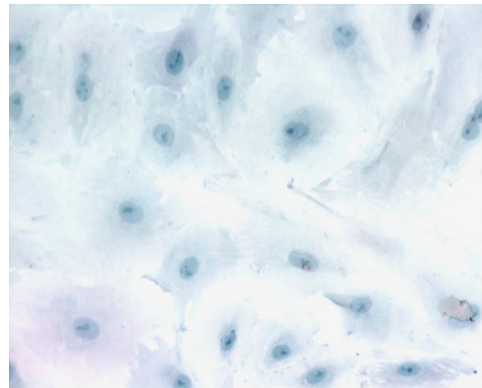
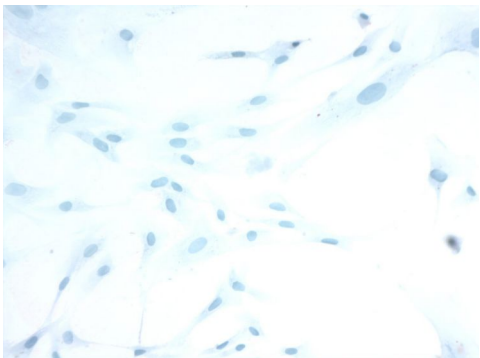
Im Gegensatz zu den negativen Ergebnissen bei allen anderen porkinen und humanen Zellkulturen sowie Paraffinschnitten in dieser Versuchsgruppe ließen sich mit dem Antikörper Anti-CD-68 bei diesen Zellen eindeutig positive Reaktionen nachweisen. Fast alle der auf dem Objektträger befindlichen RPE-Zellen wiesen bei Verwendung des AK Anti-CD-68 starke rote Markierungen auf, entsprechend einer Markierung Grad V (vgl. Abb. 3.12 a). Dies galt sowohl für durchgehend kultivierte als auch für aufgetaute RPE-Zellen.

Bei Testung des AK Anti-S-100 ließen sich keine Markierungen der humanen RPE-Zellen zeigen (vgl. Abb. 3.12 b).

Ebenfalls negative Ergebnisse zeigten sich bei allen Wiederholungsversuchen der humanen RPE-Zellen mit dem AK Anti-S-100-A2 (vgl. Abb. 3.12c). In diesen Versuchen wurden ausschließlich aufgetaute Zellen verwendet.

Die Abbildungen 3.12 a-c zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an humanen RPE-Zellen in Versuchsgruppe I.



**Abb. 3.12: Versuchsgruppe I: Kulturen humane RPE-Zellen****a)****b)****c)**

- a) Humane RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 10-fach)**
- b) Humane RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 40-fach)**
- c) Humane RPE-Zellen (P3-aufgetaute Zellen): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)**

**3.2.2.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels****3.2.2.3.1 Porkine Zellkulturen des Ziliarkörper-Epithels**

Die Resultate der Immunmarkierungen mit den Zellen des CB-Epithels entsprachen im Grundsätzlichen denen der porkinen Hyalozyten der Versuchsgruppe I: während keine Reaktivität der Zellen mit dem AK Anti-CD-68 nachzuweisen war, konnten in allen Wiederholungsversuchen positive Reaktionen mit den AK Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 gezeigt werden.

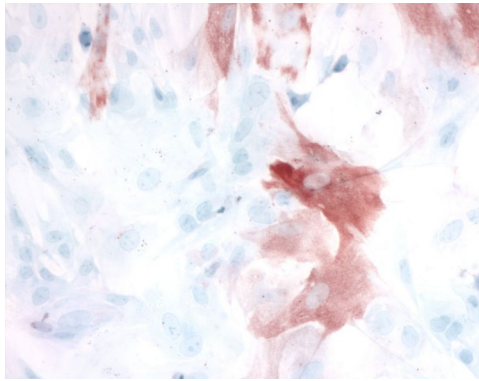
Bezüglich der Markierungen mit diesen Antikörpern zeigten sich individuelle Besonderheiten bei den Zellen des CB-Epithels: so war bei Anwendung des AK Anti-S-100-A2 bei den Zellen in PK und P3 eine Markierung Grad II zu beobachten. Dabei ließ sich – besonders deutlich bei den CB-Epithel-Zellen der Passage 3 – ein Zusammenhang zwischen den markierten Zellen und deren Auftreten sowie der Zellform feststellen. Es fiel auf, dass die gefärbten Zellen nicht gleichmäßig auf dem Präparat verteilt waren, sondern diese Zellen zumeist in kleinen Gruppen vorlagen. Dabei fanden sich immer eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (vgl. Abb. 3.13 a-d), es handelte sich somit nicht um eine Ansammlung von ausschließlich markierten Zellen nebeneinander. Vielmehr ließen sich die markierten Zellen vermehrt in bestimmten Arealen finden (vgl. Abb. 3.13 b).

Diese deutliche Ansammlung durch den AK Anti-S-100-A2 markierter Zellen war eine typische Besonderheit bei den Zellen des CB-Epithels. Bezüglich des markierten Zelltypus fiel auf, dass es sich bei den gefärbten Zellen zumeist nur selten um die länglichen 'fibroblasten-artigen' Zellen, sondern zum größten Teil um die bei der Darstellung des Zellkulturverlaufs unter 3.1.3 beschriebenen großen und zumeist einzeln vorkommenden Zellen handelte (vgl. Abb. 3.13 a-d). So zeigten sich bei den Zellen des CB-Epithels positive Reaktionen mit dem AK Anti-S-100-A2 mit einem vor allem in der Passage 3 für diese Zellen typischen Färbeverhalten.

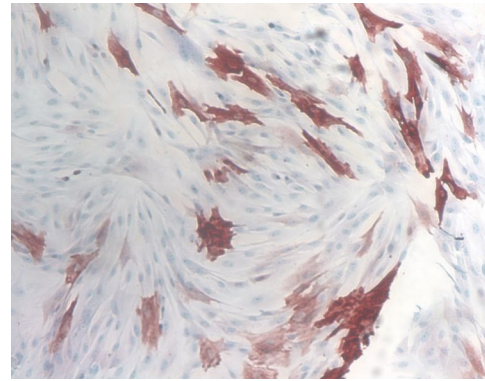
Bei den Immunmarkierungen der Zellen des CB-Epithels mit dem Antikörper Anti-S-100 war wie bei den Resultaten der porkinen Hyalozyten bei Testung dieses Antikörpers der größte Teil der Zellen nicht angefärbt. Für CB-Epithel-Zellen der PK und P3 wurde eine Markierung Grad I mit AK Anti-S-100 konstatiert (vgl. Abb. 3.13 e). Die markierten Zellen lagen zumeist einzeln oder in kleineren Gruppen vor und unterschieden sich morphologisch nicht von den nicht markierten Zellen.

Bei Verwendung des Antikörpers Anti-CD-68 hingegen zeigten sich an den Zellen des CB-Epithels weder in den PK noch bei den Zellen der P3 positive Reaktionen (vgl. Abb. 3.13 f).

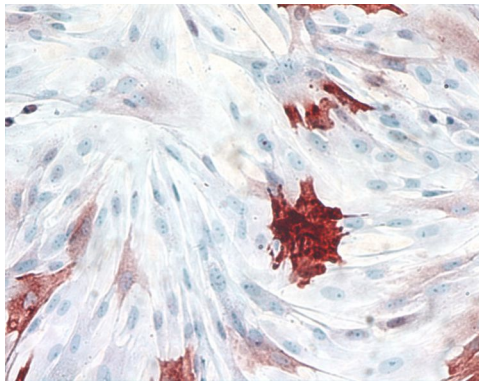
Die Abbildungen 3.13 a-f zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen Zellen des CB-Epithels in Versuchsgruppe I.

**Abb. 3.13: Versuchsgruppe I: Kulturen porkine Ziliarkörper-Epithels**

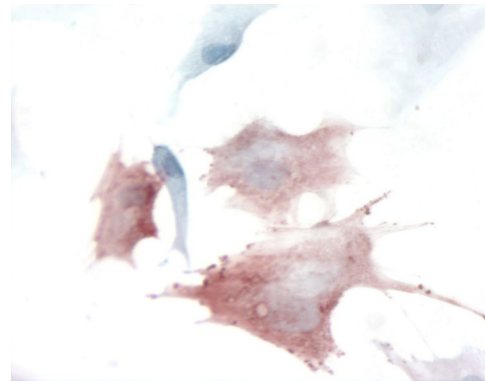
a)



b)



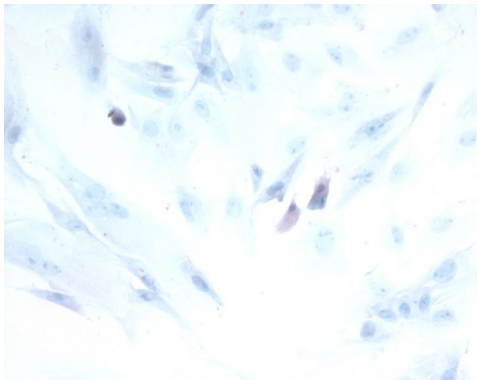
c)



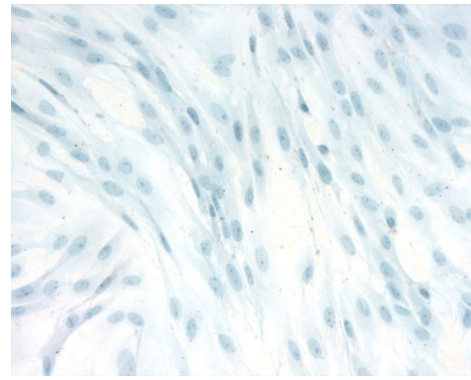
d)

- a) **Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergrößerung 20-fach)**
- b) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, typisches Verteilungsmuster der markierten Zellen (Vergrößerung 10-fach)**
- c) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, typisches Verteilungsmuster der markierten Zellen (Vergrößerung 20-fach)**
- d) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergrößerung 40-fach)**





e)



f)

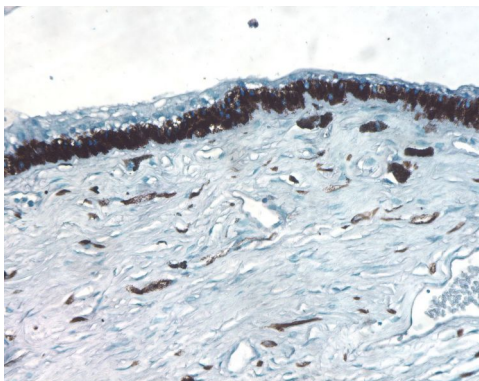
- e) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad I mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)**  
f) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)**

#### 3.2.2.3.2 Gewebsschnitte des porkinen Auges mit Ziliarkörper

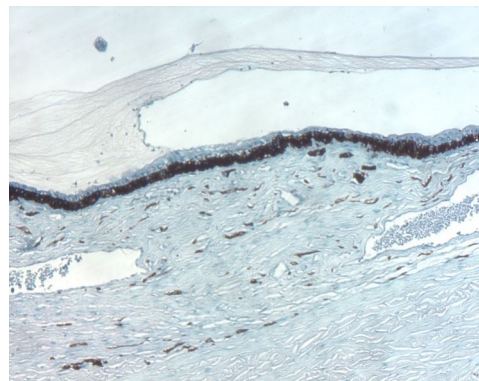
Für die Zellen des Ziliarkörper-Epithels von pars plana und pars plicata konnten im Gegensatz zu den Ergebnissen der porkinen Zellkulturen in dieser Versuchsgruppe mit allen drei getesteten Antikörpern keine positiven Reaktionen nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.14 a-c). Diese Ergebnisse bestätigten sich in allen Wiederholungsversuchen an den Paraffinschnitten.

Die Abbildungen 3.14 a-c zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an Gewebsschnitten des porkinen Auges mit Ziliarkörper in Versuchsgruppe I.

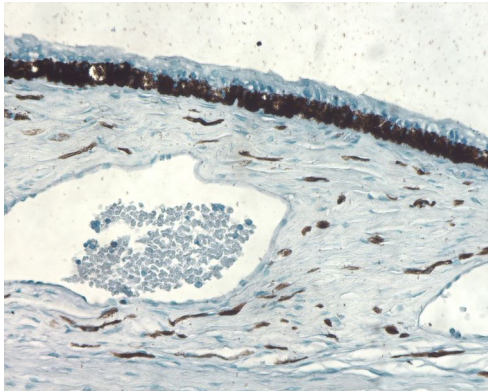
**Abb. 3.14: Versuchsgruppe I: Gewebsschnitte porkines Auge mit Ziliarkörper**



a)



b)



c)

- a) Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)
- b) Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)
- c) Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)

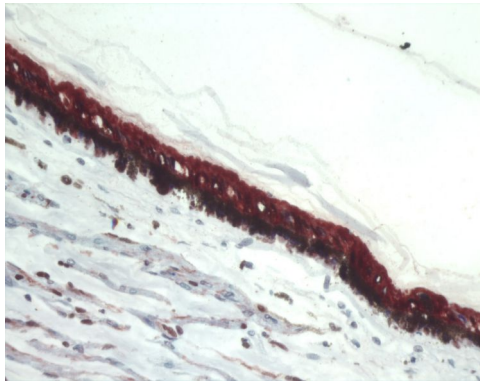
#### 3.2.2.3.3 Gewebsschnitte des humanen Auges mit Ziliarkörper

Bei den Immunmarkierungen an Paraffinschnitten der humanen Spenderaugen gelang mit dem Antikörper Anti-S-100 die Markierung des nicht pigmentierten Epithels (NPE) des Ziliarkörpers. Dabei war die Anfärbung der Zellen dieser Epithelschicht im Bereich von pars plana und pars plicata gleichermaßen zu erkennen (vgl. Abb. 3.15 a, b).

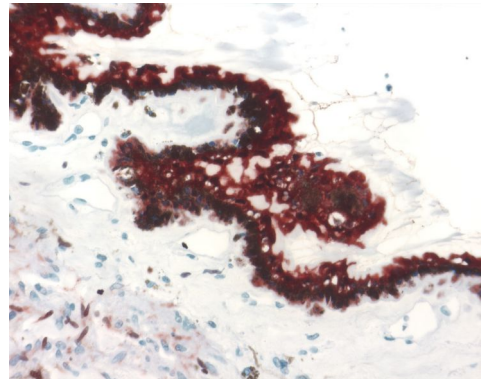
Bei Verwendung des Antikörpers Anti-S-100-A2 zeigte sich keinerlei Anfärbung der Zellschichten des CB-Epithels, weder im pigmentierten noch im nicht pigmentierten Epithel (vgl. Abb. 3.15 c).

Auch bei Anwendung des Antikörpers Anti-CD-68 waren auf den Gewebsschnitten der humanen Bulbi keine markierten Zellen des CB-Epithels im Bereich der pars plana und pars plicata zu sehen (vgl. Abb. 3.15 d).

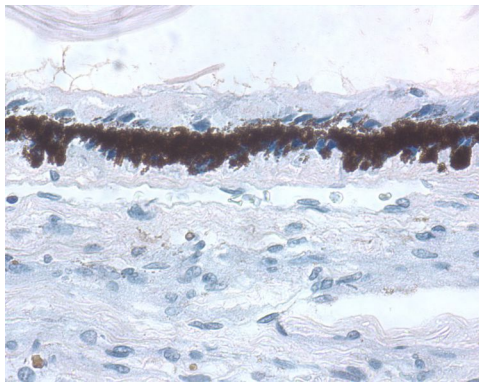
Die Abbildungen 3.15 a-d zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an den Gewebsschnitten des humanen Auges mit Ziliarkörper in Versuchsgruppe I.

**Abb. 3.15: Versuchsgruppe I: Gewebsschnitte humanes Auge mit Ziliarkörper**

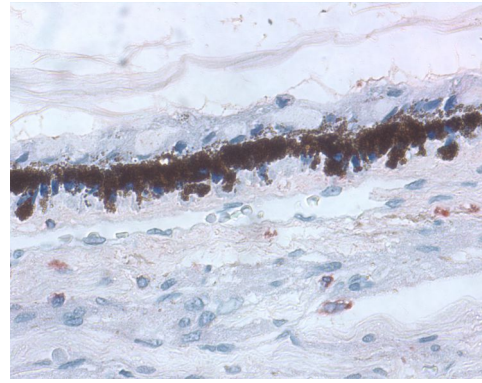
a)



b)



c)



d)

- a) Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: deutliche Markierung der NPE-Zellschicht des CB-Epithels im Bereich der pars plana mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)
- b) Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: deutliche Markierung der NPE-Zellschicht des CB-Epithels im Bereich der pars plicata mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)
- c) Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 40-fach)
- d) Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 40-fach)

### 3.2.3 Versuchsgruppe II: Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren:

#### Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen der unter 2.2.4.1.2 aufgelisteten Präparate mit den eigens für diese Arbeit hergestellten polyklonalen Antikörpern Anti-H/PI und Anti-H/PII (siehe 2.1.3.5) dargestellt.

Nachdem diese Antikörper bei unseren Experimenten erstmalig zum Einsatz kamen, erfolgt hier eine möglichst genaue Beschreibung der Resultate der mit den Antikörpern inkubierten Präparate zur erstmaligen Charakterisierung und zum Vergleich der beiden Antikörper. Aufgrund dieser Beobachtungen und durch den Vergleich mit den durchgeführten Negativkontrollen erfolgt dann die Einordnung der Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen dieser Versuchsgruppe.

Die Tabellen 3.5 und 3.6 zeigen die jeweiligen Ergebnisse für die verwendeten Zellkulturen und Gewebsschnitte im Überblick.

*Tabelle 3.5:* Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Zellkulturen in Versuchsgruppe II

	<i>Anti-H/PI</i>	<i>Anti-H/PII</i>
<b>Hyalozyten</b>		
Primärkultur	V	V
Passage 3	V	V
<b>RPE-Zellen</b>		
Primärkultur	-	V
Passage 3	I	V
<b>Zellen des CB-Epithels</b>		
Primärkultur	I	V
Passage 3	I	V

*Tabelle 3.6:* Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Paraffinpräparaten in Versuchsgruppe II

	<i>Anti-H/PI</i>	<i>Anti-H/PII</i>
<b>Gewebsschnitte Auge</b>		
CB-Epithel	+	+
Hyalozyten	+	+
<b>Glaskörper auf Objektträger</b>		
Hyalozyten	II	II

### 3.2.3.1 Hyalozyten

#### 3.2.3.1.1 Porkine Hyalozyten

Bei den mit dem Antikörper Anti-H/PI durchgeführten Immunmarkierungen konnten positive Reaktionen an den porkinen Hyalozyten sowohl in PK als auch in P3 nachgewiesen werden.

Für die Hyalozyten in PK bestätigten sich in allen Wiederholungsversuchen mit den verschiedenen Verdünnungen folgende Ergebnisse: mit einer Markierung Grad V zeigte sich der größte Teil der Zellen auf dem Präparat markiert (vgl. Abb. 3.16 a). Die Markierungen wirkten in bestimmten Bereichen kräftiger, so dass hier die Zellen gleichmäßig rot erschienen. Zwischen den verschieden stark markierten Zellen und den nicht markierten gab es morphologisch keinerlei sichtbare Unterschiede. Vielmehr schienen die jeweiligen unterschiedlich stark markierten Zellareale fließend ineinander überzugehen.

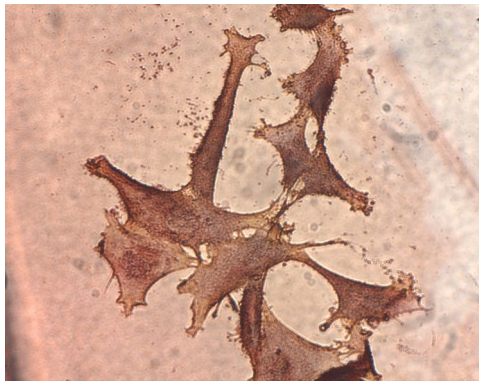
Bei den Zellen der P3 war der Anteil der markierten Hyalozyten auf dem Objektträger mit Grad V vergleichbar mit denen aus der PK (vgl. Abb. 3.16 b). Die Intensität war wie bereits beschrieben variabel.

Auch bei Anwendung des Antikörpers Anti-H/PII zeigten sich positive Reaktionen bei den Hyalozyten in PK und P3. In Bezug auf die Intensität der Färbung wies dieser Antikörper noch stärkere Reaktionen als der Antikörper Anti-H/PI auf. In der PK waren nahezu alle Zellen auf dem Objektträger rot markiert, entsprechend einer Markierung Grad V (vgl. Abb. 3.16 c). Das Färbemuster entsprach dabei dem schon für den AK Anti-H/PI beschriebenen.

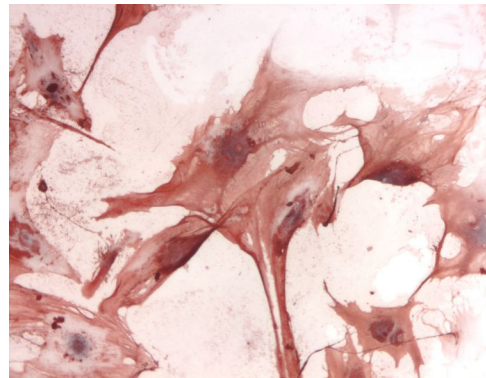
Auch bei den Zellen in P3 zeigte sich bei Testung des AK Anti-H/PII mit Grad V der Großteil der Zellen auf den Objektträgern rot markiert (vgl. Abb. 3.16 d). Färbeverhalten und -muster verhielten sich wie für die Hyalozyten in PK beschrieben, wobei die wenigen nicht angefärbten Zellen sich morphologisch nicht von den gefärbten Zellen unterschieden.

Die Abbildungen 3.16 a-d zeigen die Ergebnisse der Immunmarkierungen an porkinen Hyalozyten in Versuchsgruppe II.

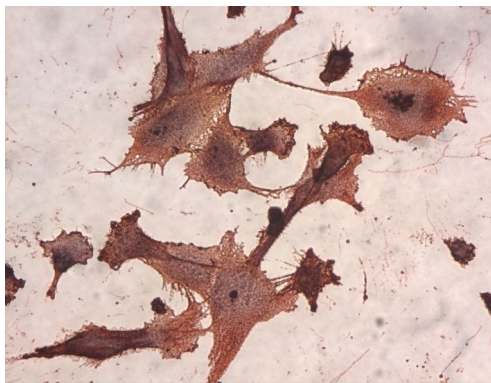


**Abb. 3.16: Versuchsgruppe II: Zellkulturen porkine Hyalozyten**

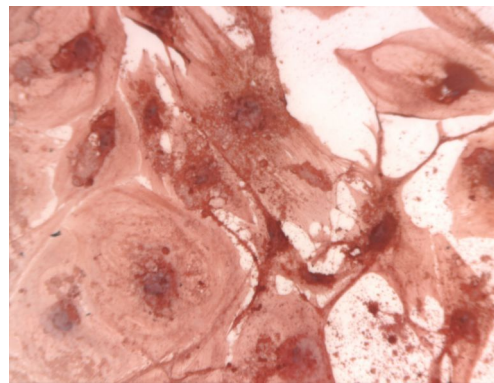
a)



b)



c)



d)

- a) Porkine Hyalozyten (PK): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)  
 b) Porkine Hyalozyten (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)  
 c) Porkine Hyalozyten (PK): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)  
 d) Porkine Hyalozyten (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)

### 3.2.3.1.2 Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten

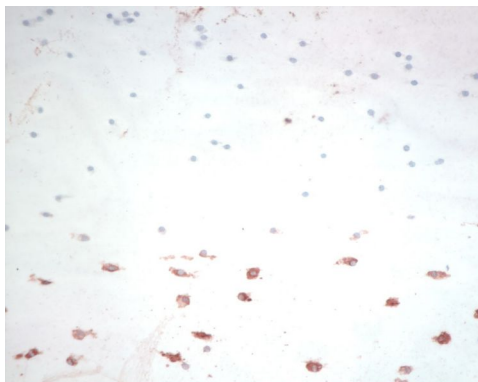
Nach Durchführung der immunhistochemischen Markierung zeigten sich die GK-Präparate auf den Objektträgern wie bereits unter 3.2.1.1 dargestellt, der Großteil der GK-Matrix war blauviolett gefärbt. Die Zellkörper der Hyalozyten waren durch die Hämatoxylin-Färbung deutlich zu erkennen. Auf allen GK-Präparaten waren zahlreiche Zellen zu sehen, die regelmäßig auf dem Objektträger verteilt waren. Je nach Präparation konnte man auch die dichte Anordnung der Hyalozyten in der Äquatorialebene des GK beobachten.

Bei Verwendung beider Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII ließen sich eindeutig rot markierte Hyalozyten nachweisen (vgl. Abb. 3.17 a-c). Es zeigte sich immer nur ein gewisser Anteil der

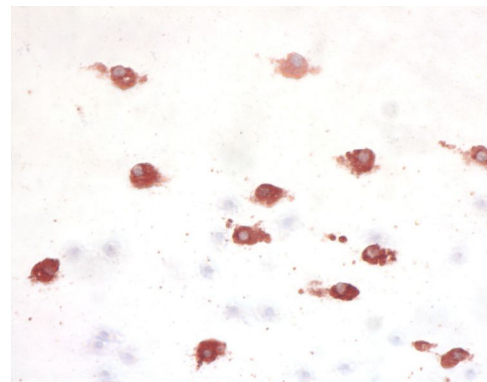
Zellen angefärbt, entsprechend einer Markierung Grad II. Diese gefärbten Hyalozyten lagen dann in Gruppen aneinander (vgl. Abb. 3.17 a). Bezüglich der Intensität der Markierung und dem Anteil der angefärbten Zellen konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Antikörpern konstatiert werden.

Die Abbildungen 3.17 a-c zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen Glaskörpern mit Hyalozyten in Versuchsgruppe II.

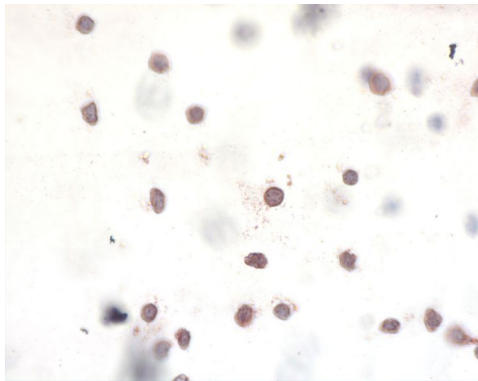
Abb. 3.17: Versuchsgruppe II: Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten



a)



b)



c)

- a) Porkiner GK mit Hyalozyten: Markierung Grad II mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
- b) Porkiner GK mit Hyalozyten: deutliche Markierung der Zellen mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 40-fach)
- c) Porkiner GK mit Hyalozyten: Markierung Grad II mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)

### 3.2.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels

Bei den Immunmarkierungen der Versuchsgruppe II ließen sich mit beiden Antikörpern an den Zellen des RPE positive Reaktionen zeigen.

Bei Verwendung des AK Anti-H/PI war bei den Zellen der P3 eine Markierung Grad V zu sehen (vgl. Abb. 3.18 b). Es lagen immer Areale markierter Zellen neben Arealen nicht markierter Zellen vor, wobei keine morphologischen Unterschiede zwischen angefärbten und nicht angefärbten Zellen zu sehen waren.

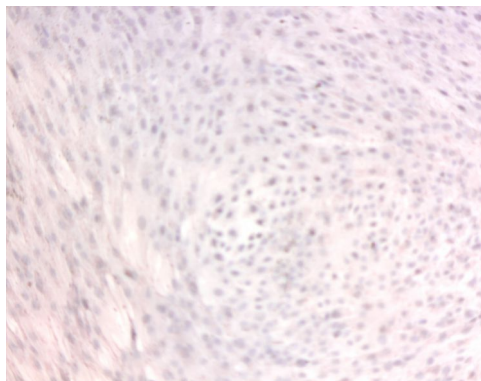
Bei den Versuchen mit den PK der RPE-Zellen hingegen konnten bei Verwendung von Anti-H/PI keine eindeutig positiven Reaktionen aufgezeigt werden. So waren an manchen Stellen rote punktförmige Markierungen zu sehen, die jedoch keinen konkreten Bezug zu bestimmten Zellstrukturen hatten und deshalb eher als Artefakte denn als immunhistochemische Reaktion betrachtet wurden. Die restlichen Zellen auf den Präparaten wiesen keinerlei erkennbar gefärbte Strukturen auf und wurden als negativ eingestuft (vgl. Abb. 3.18 a).

Bei den Immunmarkierungen mit dem AK Anti-H/PII zeigte sich an den RPE-Zellen wie schon bei den Hyalozyten-Kulturen in dieser Versuchsgruppe verglichen mit dem AK Anti-H/PI eine grundsätzlich stärkere Markierung bezüglich der Intensität. So waren bei den RPE-Zellkulturen der P3 mit Grad V nahezu alle auf dem Objektträger befindlichen Zellen rot gefärbt (vgl. Abb. 3.18 d). Auch hier konnten die bereits unter 3.2.3.1.1 für diese Antikörper beschriebenen typischen Unterschiede in der Stärke der Markierung beobachtet werden.

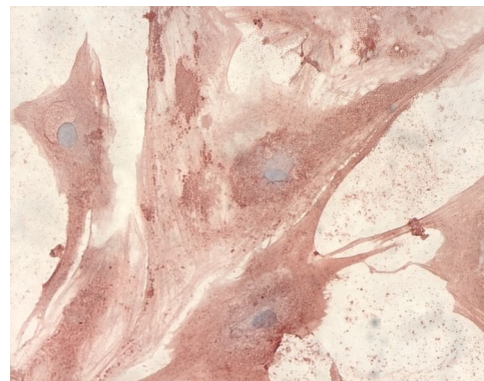
Bei den RPE-Zellen in der PK hingegen waren solch starke Markierungen, wie bei den Immunmarkierungen dieser Zellen aus P3 mit AK Anti-H/PII, nicht zu sehen. In allen Wiederholungsversuchen zeigten sich bei Verwendung des AK Anti-H/PII nur wenige beziehungsweise nur schwach markierte RPE-Zellen, entsprechend einer Markierung Grad I. In bestimmten Bereichen waren hellrote punktförmige Färbungen zu sehen, die sich jedoch nicht eindeutig bestimmten Zellen zuordnen ließen. Zusätzlich fanden sich Zellen, die eine helle rote Markierung aufwiesen (vgl. Abb. 3.18 c). So zeigten sich verglichen mit den Negativkontrollen eindeutig markierte Zellen.

Die Abbildungen 3.18 a-d zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen RPE-Zellen in Versuchsgruppe II.

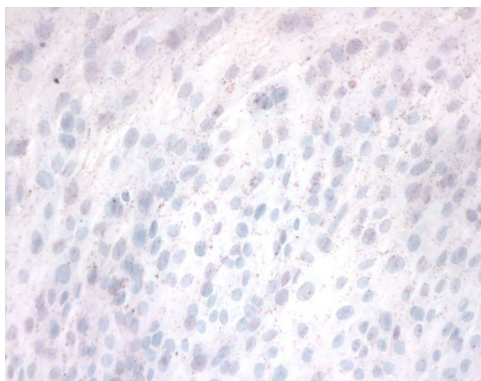


**Abb. 3.18: Versuchsgruppe II: Kulturen porkine RPE-Zellen**

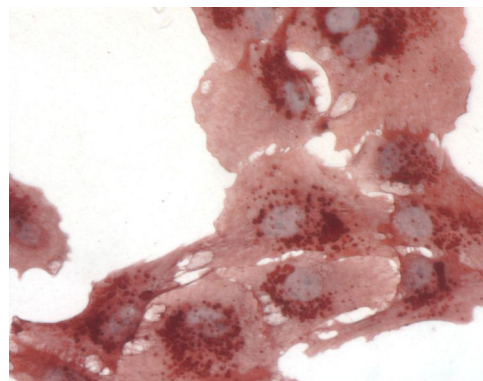
a)



b)



c)



d)

- a) Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 10-fach)  
b) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 40-fach)  
c) Porkine RPE-Zellen (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)  
d) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)

**3.2.3.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels****3.2.3.3.1 Porkine Zellkulturen des Ziliarkörper-Epithels**

Auch bei den Immunmarkierungen an Zellen des CB-Epithels konnten für beide Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII positive Reaktionen nachgewiesen werden.

Hierbei zeigte sich bei Verwendung des AK Anti-H/PI für die CB-Epithel-Zellen der P3 eine Markierung Grad V (vgl. Abb. 3.19 b). Bezüglich Stärke und Verteilung der markierten Zellen zeigten sich die bereits bei den Hyalozyten und RPE-Zellen in dieser Versuchsgruppe dargestellten Charakteristika (siehe 3.2.3.1.1, 3.2.3.2).

Von diesen Ergebnissen der Immunmarkierungen an Zellen des CB-Epithels der P3 mit AK Anti-H/PI unterschieden sich die Ergebnisse der Zellen des CB-Epithels in PK. Hier zeigte sich vor allem in den dicht bewachsenen Arealen keine Anfärbung der Zellen. So konnte insofern eine morphologische Besonderheit der markierten Zellen festgestellt werden als dass es sich hierbei zumeist um die einzeln vorliegenden handelte: bei den Zellen des CB-Epithels in PK konnte eine Markierung Grad I mit dem AK Anti-H/PI nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.19 a).

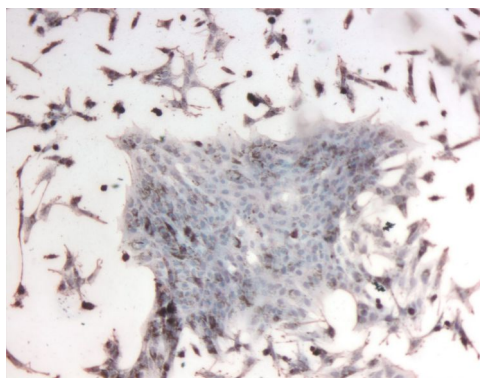
Bei Testung des AK Anti-H/PII bestätigten sich auch bei den Zellen des CB-Epithels die, verglichen mit dem AK Anti-H/PI bereits bei den Ergebnissen der Markierungen an RPE-Zellen und Hyalozyten in dieser Versuchsgruppe beobachteten, stärkeren immunhistochemischen Markierungen.

Bei allen Wiederholungsversuchen mit Zellen des CB-Epithels in P3 wurden Markierungen Grad V konstatiert (vgl. Abb. 3.19 d). Die Intensität der Anfärbung war dabei variabel.

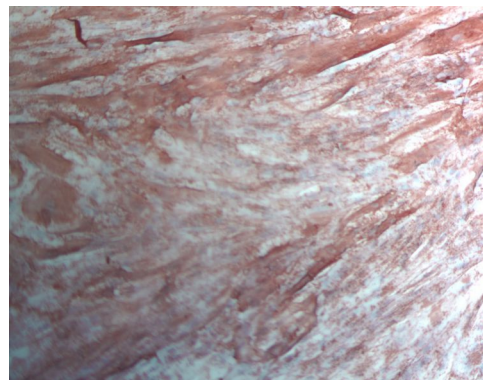
Auch für die CB-Epithel-Zellen in PK zeigten sich bei Verwendung des AK Anti-H/PII eindeutig markierte Zellen (vgl. Abb. 3.19 c). Wie schon bei den Immunmarkierungen an den PK der CB-Epithel-Zellen mit dem AK Anti-H/PI beobachtet, handelte es sich hierbei in erster Linie um die einzeln vorliegenden Zellen. Es wurde eine Markierung Grad I festgestellt. Auch bei diesen Präparaten fiel die Stärke der Markierung unterschiedlich aus, wobei sich auch hier eine klare Tendenz zu folgendem Phänomen zeigte: die Anfärbung war bei den einzeln vorkommenden Zellen stark ausgeprägt, während sie in den Arealen des dichten Wachstums nicht sicher zu erkennen war.

Die Abbildungen 3.19 a-d zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an porkinen Zellen des CB-Epithels in Versuchsgruppe II.

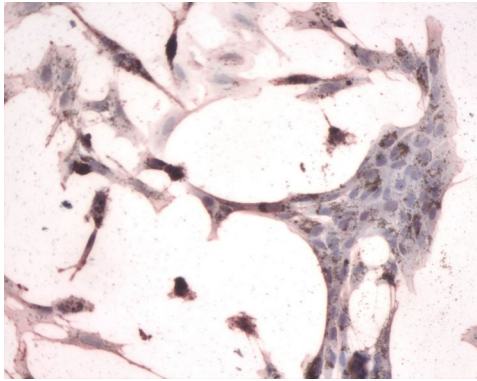
**Abb. 3.19: Versuchsgruppe II: Kulturen porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels**



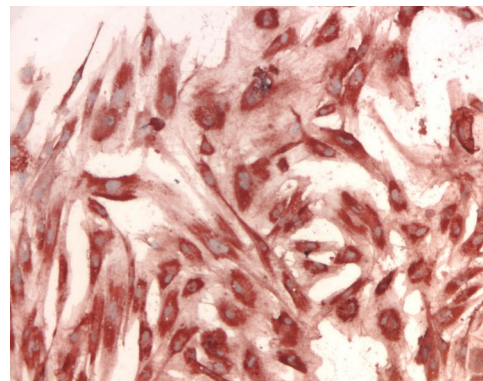
a)



b)



c)



d)

- a) **Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 10-fach)**
- b) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)**
- c) **Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)**
- d) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)**

#### 3.2.3.3.2 Gewebsschnitte des porkinen Auges mit Ziliarkörper

Bei beiden Antikörpern der Versuchsgruppe II zeigte sich in den durchgeführten Wiederholungsversuchen eine eindeutige Markierung der Zellen im nicht pigmentierten Bereich des CB-Epithels (NPE-Zellen).

Fraglich blieb eine eventuelle Anfärbung der Zellen im Bereich des pigmentierten CB-Epithels. So schienen in manchen Bereichen außerhalb der pigmentierten Zellschicht rote Anfärbungen zu sehen zu sein, die jedoch keine definitive Schlussfolgerung bezüglich einer positiven Reaktion der pigmentierten Zellschichten erlaubten.

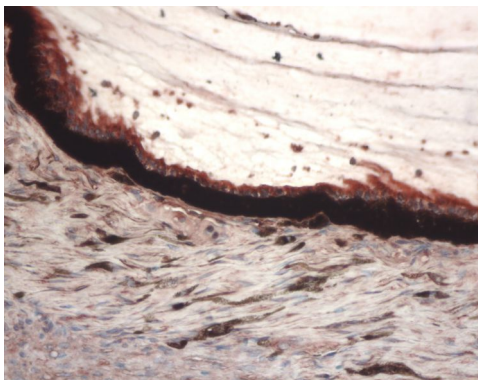
Bei den nicht pigmentierten CB-Zellen von pars plana und pars plicata war die Anfärbung gleichermaßen zu sehen (vgl. Abb. 3.20 a-d). Die bereits bei den Resultaten der Immunmarkierungen an Zellkulturen in Versuchsgruppe II festgestellte Variabilität der Anfärbung wurde auch in den Versuchen mit den Paraffinschnitten bestätigt: die Markierungen der betreffenden Zellen variierten gering in Stärke und Intensität. Falls sich auf den Präparaten noch Reste des Glaskörpers mit einzeln vorliegenden Hyalozyten befanden, zeigten sich auch diese markiert (vgl. Abb. 3.20 a, c, d). Im Gegensatz zu den festgestellten Unterschieden zwischen den Antikörpern Anti-H/PI und Anti-H/PII in Stärke und Qualität der Markierungen bei den porkinen Zellkulturen (siehe 3.2.3.1.1, 3.2.3.2, 3.2.3.3.1) ließen sich an den Gewebsschnitten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Antikörpern feststellen. Für beide galt somit



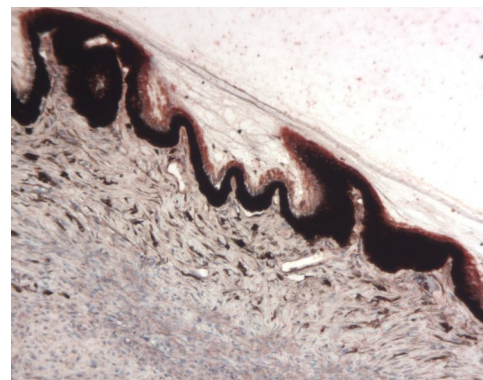
gleichermaßen die eindeutige Anfärbung des nicht pigmentierten CB-Epithels von pars plana und pars plicata sowie der angrenzenden Hyalozyten.

Die Abbildungen 3.20 a-d zeigen die Resultate der Immunmarkierungen an Gewebsschnitten des porkinen Auges mit Ziliarkörper in Versuchsgruppe II.

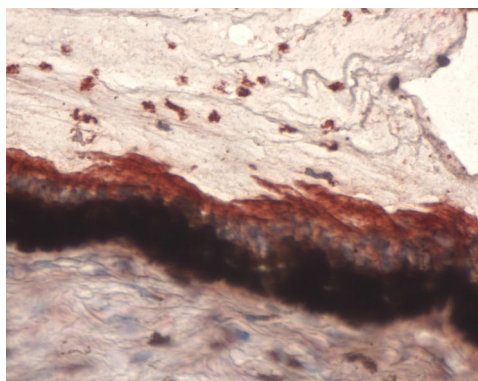
**Abb. 3.20: Versuchsgruppe II: Gewebsschnitte porkines Auge mit Ziliarkörper**



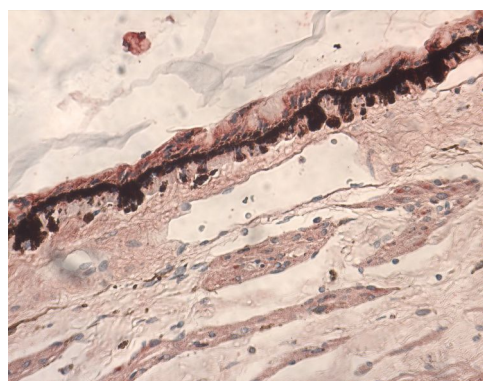
a)



b)



c)



d)

- a) Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) und der angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
- b) Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plicata) mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
- c) Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) und der angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)
- d) Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) sowie eines angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)

### 3.3 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen

Im Folgenden werden die Resultate der mit den porkinen Zellkulturen durchgeführten Färbungen mit den Alcianblau-Farbstoffen dargestellt.

Durch den bei allen Versuchen dieser Reihe wie unter 2.2.3.2.2 beschriebenen Färbeprozess mit Kernechtrot zeigten sich die Zellen und Zellkerne deutlich rot angefärbt. Die Zellen waren sowohl einzeln als auch in Arealen des dichteren Wachstums gut zu erkennen und zu beurteilen.

Deutlich blau angefärbte Strukturen dienten bei der Verwendung der beiden Alcianblau-Lösungen mit unterschiedlichen pH-Wert-Einstellungen jeweils als Nachweis für das Vorkommen von sulfatierten Glykosaminoglykane (GAG) beim pH-Wert von 1,0 und der Kombination aus Sulfat- und Carboxylgruppen in den GAG bei einer pH-Wert-Einstellung von 2,5. Bei allen Zellkulturen wurden die Ergebnisse mit und ohne vorherige Inkubation mit dem Enzym Hyaluronidase (30 Minuten) miteinander verglichen (siehe 2.2.4.2.1).

Tabelle 3.7 stellt die Ergebnisse dieser Versuche im Überblick dar.

*Tabelle 3.7:* Ergebnisse der Alcianblau-Färbungen an den porkinen Zellkulturen

	<i>pH 1,0</i>	<i>pH 2,5</i>
<b>Hyalozyten</b>		
ohne Hyaluronidase	-	+
mit Hyaluronidase	-	+
<b>RPE-Zellen</b>		
ohne Hyaluronidase	+	+
mit Hyaluronidase	+	+
<b>Zellen des CB-Epithels</b>		
ohne Hyaluronidase	+	+
mit Hyaluronidase	-	+

#### 3.3.1 Porkine Hyalozyten

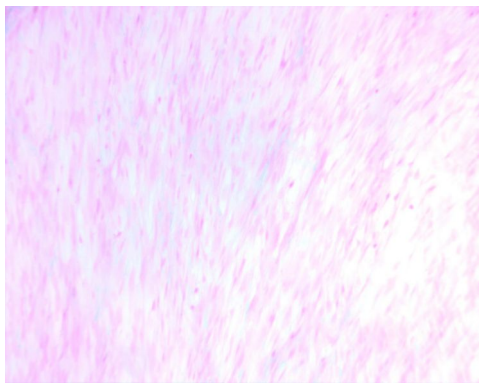
##### 3.3.1.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung

Bei den Hyalozyten-Kulturen in P3 zeigten sich bei Verwendung der beiden Lösungen mit unterschiedlicher pH-Wert-Einstellung folgende Ergebnisse:

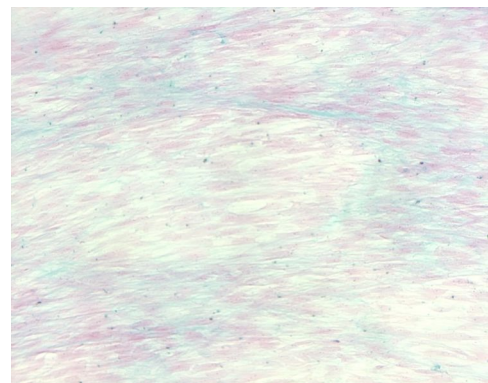
Bei den Versuchen, bei denen die auf einen pH-Wert von 1,0 eingestellte Lösung verwendet worden war, fanden sich keine eindeutig blau markierten interzellulären Strukturen (vgl. Abb. 3.21a).

Im Gegensatz dazu ließen sich bei der Verwendung der Alcianblau-Lösung mit dem pH-Wert von 2,5 in allen Wiederholungsversuchen eindeutig blau markierte Strukturen zwischen den Zellen erkennen (vgl. Abb. 3.21 b). In Gebieten mit weniger dichtem Wachstum zeigte sich vor allem im äußeren Bereich der Zelle beziehungsweise um die Einzelzelle herum die blaue Anfärbung, und auch in den Arealen des konfluenten Wachstums war in regelmäßiger Verteilung zwischen den Zellen blau angefärbte Matrix sichtbar. Vor allem aber im Bereich des dichten Zellwachstums zeigte sich eine starke Anhäufung der blau gefärbten extrazellulären Strukturen (vgl. Abb. 3.21 c). Die Abbildungen 3.21 a-c zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen Hyalozyten ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.

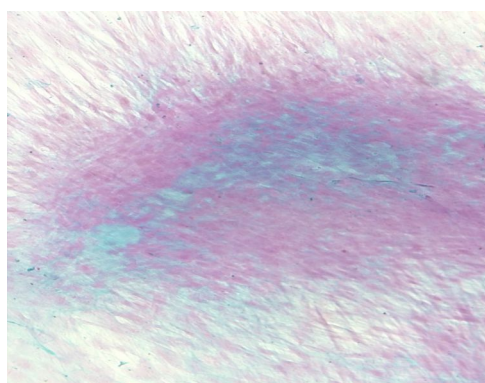
**Abb. 3.21: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Hyalozyten**



**a)**



**b)**



**c)**

- a) Porkine Hyalozyten (P3): kein Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)**
- b) Porkine Hyalozyten (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)**
- c) Porkine Hyalozyten (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)**

### 3.3.1.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung

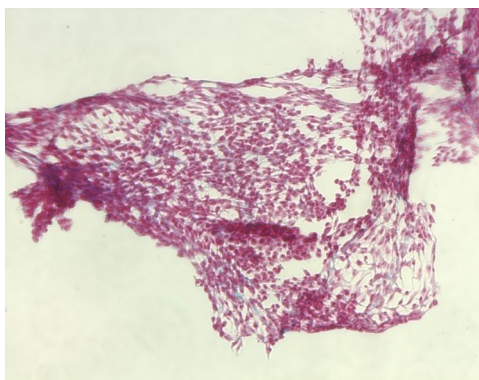
Die 30-minütige Einwirkung des Enzyms Hyaluronidase vor Durchführung der Alcianblau-Färbungen veränderte das Bild des Hyalozyten-Zellrasens deutlich. So lösten sich die Zellen in großen Bereichen des Glasplättchens ab, so dass nur noch circa 10-20% der vorher auf dem Plättchen befindlichen Zellen zu sehen waren. Diese lagen vor allem in den Randbereichen und zeigten deutliche morphologische Veränderungen: die Zellkörper der Hyalozyten waren stark komprimiert und allesamt auf eine kugelige Form zusammengeschrumpft (vgl. Abb. 3.22 a, b).

Bezüglich des Nachweises blau gefärbter extrazellulärer Substanzen bestätigten sich die schon unter 3.3.1.1 beobachteten Resultate. Es konnte mit der Lösung der pH-Wert Einstellung 1,0 keine eindeutig angefärbte Matrix nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.22 a).

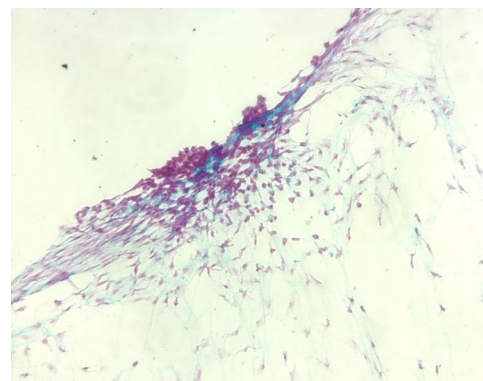
Bei Anwendung der Lösung mit dem pH-Wert 2,5 konnten deutlich blau gefärbte Strukturen zwischen den Zellen beobachtet werden. Verglichen mit den nicht enzymatisch vorbehandelten Präparaten fiel die Menge dieser Strukturen jedoch geringer aus (vgl. Abb. 3.22 b). So bestätigte sich auch in allen Wiederholungsversuchen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung der eindeutige Nachweis blau angefärbter extrazellulärer Substanzen für die Alcianblau-Lösung mit einer pH-Wert-Einstellung von 2,5.

Die Abbildungen 3.22 a und b zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen Hyalozyten mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.

**Abb. 3.22: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Hyalozyten**



a)



b)

- a) Porkine Hyalozyten (P3): kein Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)
- b) Porkine Hyalozyten (P3): Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5, Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)



### 3.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels

#### 3.3.2.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung

Im Gegensatz zu den entsprechenden Versuchen an porkinen Hyalozyten, bei denen nur mit der Alcianblau-Lösung mit dem pH-Wert 2,5 extrazelluläre Matrix (ECM) detektiert werden konnte, ließ sich bei den RPE-Zellen die deutliche Anfärbung von ECM bei Lösungen beider pH-Wert-Einstellungen zeigen.

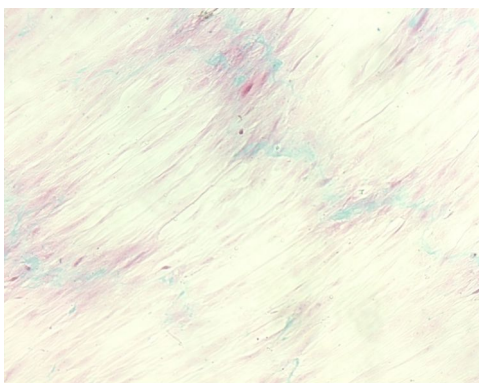
Die blauen Anfärbungen bei der Alcianblau-Lösung mit pH-Wert 1,0 waren vermehrt in den Gebieten des dichten Zellwachstums zu sehen (vgl. Abb. 3.23 b). Hier fanden sich zumeist mehrere kräftig blau gefärbte Ansammlungen inmitten des Zellrasens. Aber auch in den Bereichen des weniger dichten Wachstums konnte man eindeutig die blau gefärbte extrazelluläre Matrix zwischen den Zellen erkennen (vgl. Abb. 3.23 a).

Für die Alcianblau-Lösung mit dem pH-Wert von 2,5 fanden sich bei den RPE-Zellen vergleichbare Resultate: der Nachweis der blau angefärbten Strukturen sowohl in den Arealen des dichten Zellwachstums (vgl. Abb. 3.23 d) als auch zwischen den weniger dicht wachsenden Zellen (vgl. Abb. 3.23 c) bestätigte sich in allen Wiederholungsversuchen.

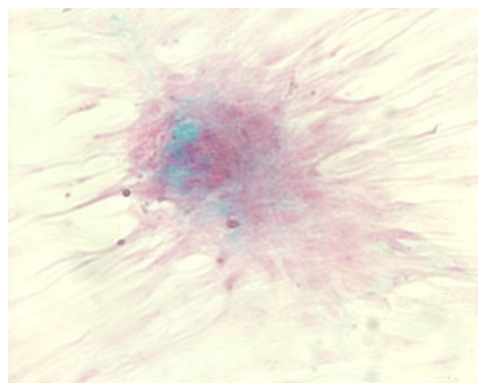
Diese Markierungen entsprachen sowohl in Intensität der Färbung als auch in Menge und Verteilung der angefärbten ECM den in den RPE-Kulturen mit der Lösung mit pH-Wert 1,0 beobachteten.

Die Abbildungen 3.23 a-d zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen RPE-Zellen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.

**Abb. 3.23: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine RPE-Zellen**

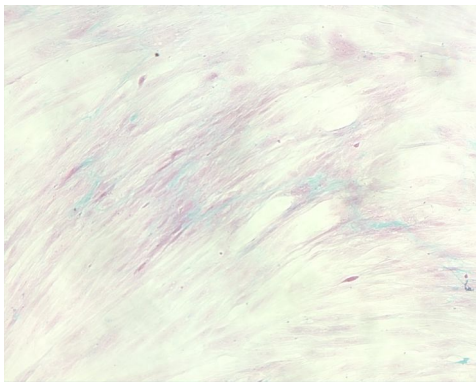


a)

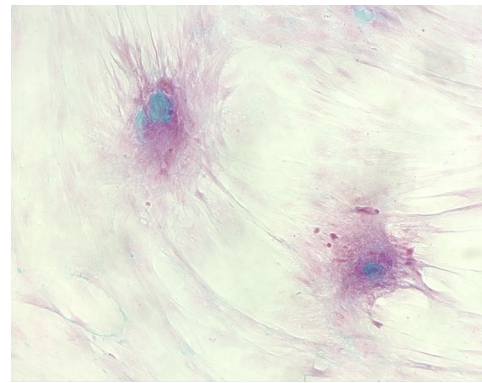


b)





c)



d)

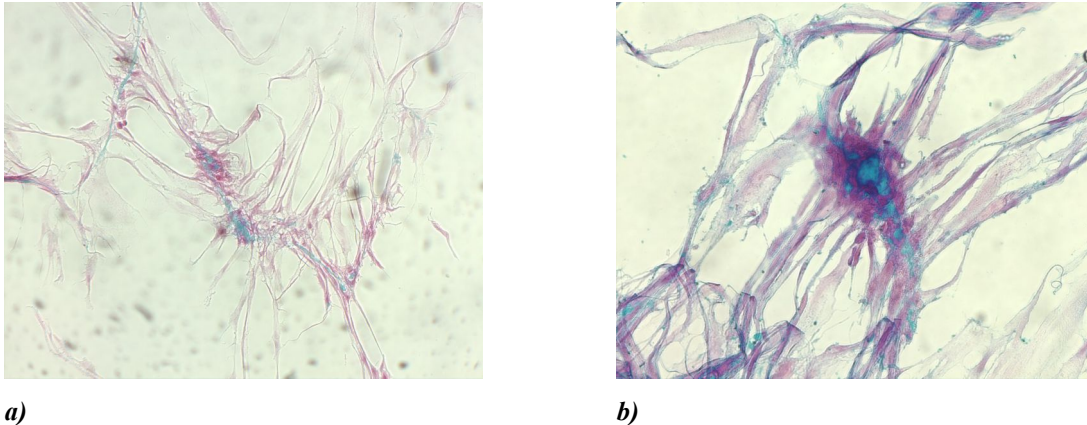
- a) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)
- b) Porkine RPE-Zellen (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 20-fach)
- c) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)
- d) Porkine RPE-Zellen (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 20-fach)

### 3.3.2.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung

Bei den Präparaten, bei denen vor Durchführung der Färbung mit Alcianblau-Farbstoffen die 30-minütige Inkubation mit Hyaluronidase erfolgt war, zeigte sich eine Reduzierung der Anzahl der RPE-Zellen auf dem Glasplättchen auf circa 10-20%. Zusätzlich waren durch die Vorbehandlung mit dem Enzym Veränderungen bezüglich der Zellmorphologie zu sehen, die einzelnen RPE-Zellen waren durch das Enzym deutlich komprimiert (vgl. Abb. 3.24 a, b).

Bei Anwendung der Alcianblau-Lösungen beider pH-Wert-Einstellungen fand sich analog zu den Versuchen ohne vorherige Behandlung mit dem Enzym Hyaluronidase blau gefärbte ECM. Diese war regelmäßig verteilt zwischen den Zellen zu finden beziehungsweise lag diesen an (vgl. Abb. 3.24 a, b). Die intensivsten Anfärbungen fanden sich auch hier in den Arealen des dichtesten Zellaufkommens. Die unter 3.3.2.1 dargestellten extrazellulären Markierungen ließen sich somit auch für die Präparate mit enzymatischer Vorbehandlung bestätigen, wobei die Menge der angefärbten Substanzen entsprechend geringer ausfiel.

Die Abbildungen 3.24 a und b zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen RPE-Zellen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.

**Abb. 3.24: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine RPE-Zellen**

- a) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 1,0, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)**
- b) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 2,5, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 20-fach)**

### 3.3.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels

#### 3.3.3.1 Resultate ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung

Auch bei den Zellkulturen des CB-Epithels ließen sich blau angefärbte extrazelluläre Strukturen mit den Alcianblau-Farbstoffen beider pH-Wert-Einstellungen nachweisen. Das Verteilungsmuster mit besonders starker Ansammlung der ECM in Arealen des dichten Wachstums entsprach den bereits beschriebenen Markierungen der ECM bei den Hyalozyten- und RPE-Zellkulturen dieser Versuchsgruppe. Jedoch ließen sich bezüglich der Menge der markierten Strukturen Unterschiede zu den beiden anderen porkinen Zelltypen feststellen:

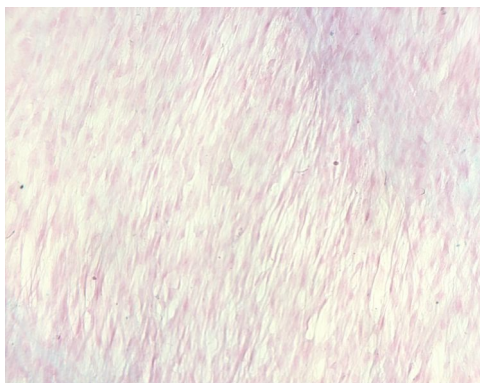
Die Menge der auf den Präparaten erkennbaren blau angefärbten Matrix bei Verwendung der Alcianblau-Lösung mit pH-Wert 1,0 war bei den Zellen des CB-Epithels im mikroskopischen Vergleich mit den entsprechenden RPE-Zellkulturen geringer. Zwar ließen sich auch hier in regelmäßiger Verteilung blau gefärbte Strukturen zwischen den Zellen beobachten (vgl. Abb. 3.25 a), jedoch waren diese in Arealen des weniger dichten Zellwachstums nur sehr spärlich vorhanden. Auch in Gebieten des dichten Zellwachstums wirkte die blaue Markierung tendenziell schwächer. Trotzdem konnte in allen Wiederholungsversuchen eine – im Vergleich mit den Resultaten der entsprechenden Versuche mit RPE-Zellen schwächere – eindeutige Markierung der ECM erkannt

werden.

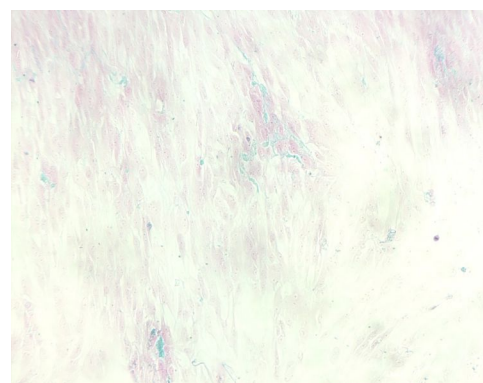
Das eben beschriebene Phänomen galt ebenfalls für die Ergebnisse der Färbungen an Zellen des CB-Epithels mit der Alcianblau-Lösung mit pH-Wert 2,5. Auch hier war der Nachweis von blau angefärbter ECM eindeutig (vgl. Abb. 3.25 b). Jedoch fiel die Menge der detektierten ECM geringer aus als dies bei den Versuchen der Alcianblau-Markierungen des pH-Werts 2,5 bei den Hyalozyten und RPE-Zellen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.21 b, c, 3.23 a-d). Im direkten mikroskopischen Vergleich ließ sich in den Zellkulturen des CB-Epithels bei Anwendung der Lösung mit pH-Wert 2,5 mehr blau angefärbte ECM als bei den Versuchen unter Verwendung der Lösung mit pH-Wert 1,0 finden.

Die Abbildungen 3.25 a und b zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen Zellen des CB-Epithels ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung.

**Abb. 3.25: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels**



**a)**



**b)**

- a) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)**
- b) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)**

### 3.3.3.2 Resultate mit Hyaluronidase-Vorbehandlung

Auch bei den Zellen des CB-Epithels fiel die Veränderung der Zellmorphologie durch die enzymatische Vorbehandlung mit Hyaluronidase auf. Die Zellen zeigten sich kugelig kompensiert (vgl. Abb. 3.26 a, b), des Weiteren ließ sich auch hier die Ablösung eines Großteils des Präparates feststellen.

Bezüglich des Nachweises von ECM unterschieden sich die Resultate von denen ohne vorherige Hyaluronidase-Vorbehandlung. Bei beiden Lösungen mit den verschiedenen pH-Wert-Einstellungen führte, wie bereits bei den Versuchen mit den Hyalozyten und RPE-Zellen beobachtet (siehe 3.3.1.2, 3.3.2.2), die Wirkung des Enzyms zu einer Reduktion der nachweisbaren Menge extrazellulärer Substanzen.

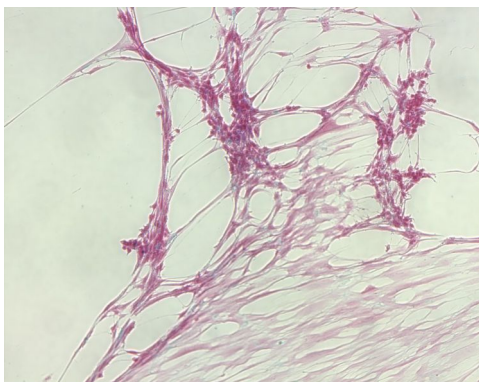
Bei der Lösung mit der pH-Wert-Einstellung von 1,0 hatte dies bei den CB-Epithel-Kulturen zur Folge, dass sich keine eindeutig blau markierte Matrix mehr erkennen ließ (vgl. Abb. 3.26 a).

Bei der Lösung mit dem pH-Wert von 2,5 hingegen war bei diesen Zellen auch nach dem enzymatischen Verdau noch eindeutig blau angefärbte Matrix zu sehen, die verglichen mit den nicht mit dem Enzym vorbehandelten Präparaten geringer ausfiel (vgl. Abb. 3.26 b).

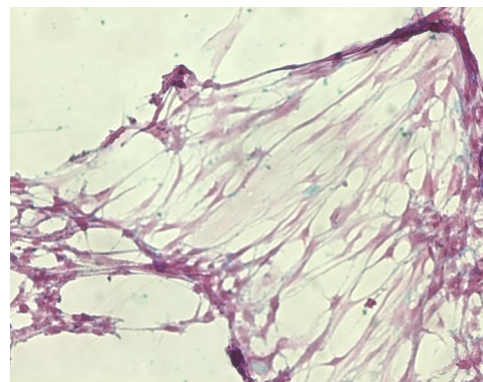
So hatte die Hyaluronidase-Vorbehandlung zur Folge, dass bei den Zellkulturen des CB-Epithels der Nachweis von sulfatierten extrazellulären Substanzen durch die Alcianblau-Lösung mit pH-Wert 1,0 nicht mehr möglich war, während sich mit der Lösung mit pH-Wert-Einstellung von 2,5 noch ECM in geringen Mengen darstellen ließen.

Die Abbildungen 3.26 a und b zeigen die Resultate der Alcianblau-Färbungen an porkinen Zellen des CB-Epithels mit Hyaluronidase-Vorbehandlung.

**Abb. 3.26: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels**



a)



b)

- a) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Kein Nachweis von extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 nach enzymatischer Vorbehandlung, deutliche Veränderung der Zellmorphologie (Vergrößerung 10-fach)**
- b) **Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 20-fach)**

## 4. Diskussion

### 4.1 Zellkulturverlauf

Da das Wachstum und die morphologischen Charakteristika der von uns untersuchten Zelltypen sowie deren typische Veränderungen im Verlauf einen wichtigen Teil der Charakterisierung der jeweiligen Zellen darstellen, sollen diese im Folgenden diskutiert und mit Ergebnissen anderer wissenschaftlicher Arbeiten verglichen werden.

#### 4.1.1 Porkine und humane Hyalozyten

Wie unter 3.1.1.1 beschrieben, vollzogen sich in unseren Experimenten bei den porkinen Hyalozyten bereits zu Beginn der Kultivierung morphologische Veränderungen (vgl. Abb. 3.1 a, b).

Veränderungen der Hyalozyten im Wachstumsverlauf und unterschiedliche morphologische Gestalt der Zellen wurden für verschiedene Spezies von anderen Autoren beschrieben.<sup>30 - 34, 57, 68, 99</sup>

In den folgenden Passagen nahmen die porkinen Zellen in unseren Versuchen rasch das 'fibroblasten-artige' Aussehen an. Wie unter 3.1.1.2 dargestellt, konnte diese Morphologie auch bei den humanen Hyalozyten der P3 beobachtet werden (vgl. Abb. 3.2 a). Die Kultivierungszeiten der porkinen Hyalozyten im weiteren Wachstumsverlauf ab der P1 waren im Vergleich mit den PK wesentlich kürzer, wie dies auch bei den Kulturen der RPE-Zellen und den Zellen des CB-Epithels beobachtet wurde (vgl. Grafiken 3.1, 3.2, 3.3).

Die von uns mikroskopisch beobachteten intrazellulären Granula (vgl. Abb. 3.1 c) werden in zahlreichen Arbeiten beschrieben.<sup>14, 31 - 33, 57, 69, 78</sup>

Besonders ausführlich wurde das Wachstum von Hyalozyten in Zellkultur in den Arbeiten von François et al. dargestellt.<sup>30 - 34</sup> In diesen Experimenten erfolgte das Wachstum der Zellen jedoch vom GK ausgehend auf den Boden der Zellkulturflaschen. Diese Art der Kultivierung der Hyalozyten wurde 2007 auch von Nishitsuka et al. beschrieben<sup>68</sup>.

François et al.<sup>30 - 34</sup> konstatierten die Formveränderung der Zellen in die 'Fibroblasten-Form' nach Kontakt mit dem Flaschenboden, wie dies auch in unseren Versuchen beobachtet werden konnte (vgl. Abb. 3.1 b, 3.2 a). Die Trypsinierung der Zellen in PK war in den Versuchen von François et al. bereits nach 4-8 Tagen möglich, unter unseren Versuchsbedingungen zeigte sich mit durchschnittlich knapp 29 Tagen eine längere

Kultivierungszeit bis zum konfluenten Wachstum (vgl. Grafik 3.1). Ein Grund hierfür könnte neben unterschiedlichen Kulturbedingungen in der Präparationsmethode liegen: die von uns wie unter 2.2.1.1 beschrieben durchgeführte Präparation der Hyalozyten hat bei geringerer Anzahl an Zellen zu Beginn der Kultivierung eine sehr hohe Spezifität.

Die, wie unter 3.1.1.1 und 3.1.1.2 beschrieben, nahezu unveränderte 'fibroblasten-artige' Morphologie der Hyalozyten mit länglichen Zellkörpern im weiteren Kulturverlauf (vgl. Abb. 3.1 b, 3.2 a) schilderten auch François et al. für ihre Hyalozyten-Subkulturen.<sup>30 - 34</sup>

In unseren Versuchen konnten bei den Hyalozyten-Kulturen Unterschiede beim Wachstum auf Glasplättchen und auf Plastik-Untergrund festgestellt werden. Im Gegensatz zu den RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels, bei denen sich diesbezüglich keinerlei Unterschiede zeigten, konnte für die Hyalozyten ein regeres Wachstum auf dem Boden der Zellkulturflaschen festgestellt werden (siehe 3.1.1.1).

Wie für Zellen des mononukleären Systems typisch, wird für Hyalozyten die Adhärenz sowohl auf Plastik als auch auf Glas beschrieben.<sup>15</sup>

Grundsätzlich stützen unsere Beobachtungen bei der Kultivierung der Hyalozyten die Theorie einer Formveränderung der Zellen im Verlauf des Wachstums, wie sie auch von François et al. beschrieben wird.<sup>30 - 34</sup> Somit ist davon auszugehen, dass ein und dieselbe Zelle ihre Morphologie entsprechend verändert, die Hyalozyten demnach in der runden (vgl. Abb. 3.1 a) oder 'fibroblasten-artigen' Form (vgl. Abb. 3.1 b, 3.2 a) auftreten können.

Unsere Beobachtungen der Morphologie der Hyalozyten im Zellkulturverlauf zeigten keinerlei Hinweise dafür, dass es sich bei den von uns vom Cortex des Glaskörpers präparierten Zellen um zwei verschiedene Zelltypen, Hyalozyten und Fibroblasten, handelte, wie dies von anderen Autoren beschrieben wurde.<sup>6, 84</sup>

Die im Zellkulturverlauf in unseren Versuchen dargestellte Formveränderung der Hyalozyten in die 'fibroblasten-artige' Form wird auch bei pathophysiologischen Prozessen am Auge vermutet: so kommt es bei der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) zu einer unkontrollierten Zellproliferation zu beiden Seiten der Retina im Glaskörperraum. Die hierbei gebildeten periretinalen Membranen haben auch eine fibroblastische Komponente. Der exakte Ursprung dieser Zellen ist nicht bekannt, aber man nimmt an, dass 'fibroblasten-artige' Zellen unter anderem durch Metaplasie aus Hyalozyten entstehen können.<sup>43, 50, 53, 71</sup>

Nach der in unseren Versuchen beobachteten Formveränderung der Hyalozyten in den einzelnen Passagen konnten wir mikroskopisch keine weiteren morphologischen Veränderungen der Zellen feststellen. Dies entspricht den Beobachtungen anderer Arbeiten, in denen eine Kultivierung der Hyalozyten jeweils immer über die Passage 3 hinaus



durchgeführt wurde, und hierbei weder in der biologischen oder metabolischen Aktivität<sup>32, 58</sup> noch bezüglich der Morphologie<sup>32, 33, 69</sup> weitere Unterschiede in den einzelnen Passagen festgestellt werden konnten.

#### 4.1.2 Porkine und humane Zellen des retinalen Pigmentepithels

Das von uns, wie unter 3.1.2.1 dargestellt, beobachtete polygonale 'pflasterstein-artige' Wachstum der porkinen RPE-Zellen (vgl. Abb. 3.3 a) wird auch von anderen Autoren für Zellen des RPE in Kultur beschrieben.<sup>17, 24, 92, 101</sup>

Im weiteren Wachstumsverlauf traten in unseren Zellkulturen phänotypische Veränderungen der porkinen RPE-Zellen mit länglicher Morphologie auf, die im Verlauf zum dominierenden Zelltypus wurden (vgl. Abb. 3.3 d). Auch bei den humanen RPE-Zellen der P3 war, wie unter 3.1.2.2 beschrieben, die längliche Zellform zu beobachten (vgl. Abb. 3.4 a, b). Morphologische Veränderungen beim Wachstum der RPE-Zellen in Kultur werden in vorhergehenden Arbeiten bestätigt.

So schildern zahlreiche Autoren Änderungen der Morphologie der RPE-Zellen, wenn diese von ihrer natürlichen Umgebung entfernt wachsen:

in ihren Arbeiten stellten Aronson et al. und Edwards et al. bei der Kultivierung humaner RPE-Zellen in späteren Passagen ein 'längliches' Wachstum der Zellen fest.<sup>3, 24</sup>

Die Arbeitsgruppen von Vidaurri-Leal et al. und Zhu et al. bezeichnen die Formveränderung der RPE-Zellen – nach Kontakt mit GK-Matrix – als 'fibrozyten-artig'.<sup>101, 106</sup> Auch Vinos et al. beschreiben die phänotypische Plastizität der RPE-Zellen bei pathophysiologischen Vorgängen.<sup>103</sup>

Diese Veränderung der Morphologie der Zellen des RPE wird bei zahlreichen pathophysiologischen Vorgängen am Auge, wie der Bildung von epiretinalen Membranen bei der proliferativen Vitreoretinopathie, geschildert. Trotz der gesicherten Beteiligung der RPE-Zellen an der Bildung der Membranen ist eine genaue Identifizierung wegen der Veränderungen der Zellmorphologie häufig sehr schwierig.<sup>41, 43, 71, 102</sup>

Der in unseren Versuchen zu Beginn der Kultivierung konstatierte Pigmentgehalt der RPE-Zellen (vgl. Abb. 3.3 a, b) wird von Campochiaro et al. lediglich in sehr frühen Passagen als wichtiges Charakteristikum dieser Zellen beschrieben.<sup>17</sup> In unseren Versuchen nahm der sichtbare Gehalt von Melanin-Granula bei porkinen und humanen Zellkulturen in den höheren Passagen deutlich ab (vgl. Abb. 3.3 d, 3.4 b). Auch Edwards et al. konnten in ihren Versuchen ab der 5. Passage kein Pigment mehr in den RPE-Zellen feststellen<sup>24</sup>.

Der in unseren Versuchen festgestellte zeitliche Verlauf bis zum konfluenten Wachstum der RPE-Zellen (vgl. Grafik 3.2) ist mit Beobachtungen anderer Arbeiten vergleichbar:

Stramm et al. beschreiben in ihren Versuchen mit RPE-Zellen aus Katzenaugen das Erreichen des konfluenten Wachstums nach etwa 7 Tagen, die weitere Verarbeitung der Zellen erfolgte nach 2 - 4 Wochen.<sup>92</sup> Auch Edwards et al. konstatieren in ihrer Arbeit das konfluente Wachstum der PK der humanen RPE-Zellen nach 3 - 7 Tagen, die Subkulturen erreichten das konfluente Wachstum nach 2 - 4 Wochen.<sup>24</sup>

#### 4.1.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels

Einige Autoren berichten über schwierige Kulturbedingungen für die nicht pigmentierten Zellen des CB-Epithels (NPE-Zellen) bei Verwendung eines Mediums, welches fetales Rinderserum (FBS) enthält. So sei in diesen Fällen die Proliferation der pigmentierten Zellen stärker als die der nicht pigmentierten Zellen.<sup>20, 26, 27, 55</sup> Deshalb werden in diesen Arbeiten spezielle Wachstumsbedingungen für Zellen des NPE beschrieben.<sup>20, 26, 55</sup>

Hingegen beschreiben Runyan et al. die Kultivierung von CB-Epithel-Zellen unter unseren Versuchen entsprechenden Bedingungen mit Verwendung eines Rinderserum-haltigen Mediums mit konstatiertem Wachstum sowohl der PE- als auch der NPE-Zellen.<sup>77</sup> Auch Smyth et al. beschreiben das Wachstum von NPE-Zellen von Kaninchen unter Verwendung eines Mediums, das 20% FBS enthält, wobei hier zusätzlich noch 'GK-Extrakt' beziehungsweise Medium, das zuvor von PE-Zellen 'konditioniert' wurde, hinzugegeben worden war.<sup>89</sup>

Die Arbeitsgruppe von Johnson et al. verwendete für ihre in vitro Kulturen des CB-Epithels Medium, das nur 1% fetales Rinderserum enthält.<sup>48</sup>

Von Yamashita und Sears wird bei in vivo Versuchen eine ausgeprägtere Regenerationsfähigkeit sowie eine verstärkte DNA-Synthese für die NPE-Zellschicht im Vergleich mit der PE-Schicht beschrieben.<sup>105</sup>

Wie unter 3.1.3 dargestellt, zeigten auch die von uns aus dem Ziliarkörper-Epithel präparierten Zellen unter den gegebenen Kulturbedingungen reges Wachstum. Grundsätzlich war in den Primärkulturen vom hauptsächlich Vorliegen von pigmentierten und nicht pigmentierten CB-Epithel-Zellen auszugehen. Jedoch konnte aufgrund der Präparationsmethode (siehe 2.2.1.2) das Vorhandensein eines geringen Anteils an Stroma-Zellen nicht ausgeschlossen werden.



Die morphologisch verschiedenartigen Zellen in unseren Kulturen (vgl. Abb. 3.5 a-i) bestätigten das Vorhandensein von Mischkulturen. Zwar wies ein gewisser Anteil der Zellen deutlich sichtbares Pigment auf (vgl. Abb. 3.5 c, d), eine weitere Unterscheidung zwischen den Zellen war jedoch nicht möglich.

Die Zellform sowohl der PE- als auch der NPE-Zellen wird von Kitada et al. und Smyth et al. als hexagonal beschrieben.<sup>51, 89</sup>

Die Arbeitsgruppe von Runyan et al. stellt bei ihren Beobachtungen des Wachstumsverlaufs der Zellen des CB-Epithels fest, dass die Zellen in Bezug auf Größe, Form und Pigmentgehalt variieren. Nach dem Passagieren beschreiben die Autoren die Zellen als 'spindel-förmig', nach Adhärenz zeigen die Zellen Tendenz zur Vergrößerung und länglichem Wachstum.<sup>77</sup> Auch Kondo et al. berichten über die Variabilität der PE-Zellen in Kultur bezüglich Zellform und Größe.<sup>55</sup>

Wie unter 3.1.3 dargestellt, konnten auch wir in unseren Versuchen diese morphologische Vielfalt der Zellen des CB-Epithels darstellen (vgl. Abb. 3.5 a-i).

Die Wachstumsdauer bis zum konfluenten Wachstum der Zellen des CB-Epithels geben Smyth et al. bei ihren Untersuchungen an CB-Epithel-Zellen aus Kaninchenaugen unter den von ihnen angeführten Versuchsbedingungen mit 4 - 5 Wochen für Zellen des NPE und 3 Wochen für Zellen des PE an.<sup>89</sup> Runyan et al. berichten über in Wachstumskurven bestätigte Zellverdoppelungszeit bei humanen CB-Epithel-Zellen von 2 - 3 Wochen.<sup>77</sup>

Kondo et al. stellen hingegen nach 10 Tagen das konfluente Wachstum der Zellkulturen der PE-Schicht fest.<sup>55</sup>

So ist auch aufgrund des relativ schnellen Erreichens des konfluenten Wachstums bei den Zellkulturen unserer Arbeit (vgl. Grafik 3.3) von Mischkulturen, die nur zu einem gewissen Anteil NPE-Zellen enthalten, auszugehen.

Der in unseren Experimenten beobachtete Verlust des intrazellulären Pigments der Zellen im Wachstumsverlauf (vgl. Abb. 3.5 h, i) wird auch in anderen Arbeiten beschrieben:

so beschreiben Runyan et al. in ihren Untersuchungen für die pigmentierten Zellen des CB-Epithels einen Verlust des intrazytoplasmatischen Pigmentgehalts in höheren Passagen. Die Autoren folgern, dass dies entweder durch die verlorengegangene Fähigkeit der Zellen des PE zur Produktion von Pigment oder durch ein Dominieren der NPE-Zellen im Wachstumsverlauf erklärt werden kann.<sup>77</sup>

Auch die Arbeitsgruppe von Kondo et al. stellt einen kontinuierlichen Verlust des Pigmentgehalts der humanen PE-Zellen im Wachstumsverlauf dar, nach 3 Monaten in Kultur sind die Zellen ohne intrazytoplasmatisches Pigment.<sup>55</sup>

So fanden sich in unseren Zellkulturen Eigenschaften, die bei der Kultivierung von CB-Epithel-Zellen in anderen Arbeiten beschrieben werden. Der Wachstumsverlauf unter den von uns geschaffenen Kulturbedingungen bestätigt jedoch im Hinblick auf die weiteren für die Zellen des CB-Epithels beschriebenen Charakteristika das Vorliegen von Mischkulturen.

## 4.2 Immunhistochemische Markierungen

### 4.2.1 Versuchsgruppe I: Antikörper Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen in Versuchsgruppe I diskutiert. Einen Überblick der Resultate dieser Versuchsgruppe geben die Tabellen 3.1 - 3.4.

#### 4.2.1.1 Hyalozyten – porkine und humane Zellkulturen, porkiner Glaskörper

Zur Klärung der genauen Herkunft und des zellulären Ursprungs von Hyalozyten spielte bereits in zahlreichen Arbeiten die immunhistochemische Markierung mit Antikörpern eine entscheidende Rolle.<sup>39, 63, 68, 79</sup> Dies könnte den ersten Schritt zur eindeutigen Identifizierung dieses Zelltyps und dessen Differenzierungs- und Funktionszustandes darstellen.

Lazarus et al. stellten in ihrer Arbeit 'In situ characterization of the human hyalocytes'<sup>57</sup> für humane Hyalozyten das Fehlen des Epitops CD 68, das bei nahezu allen Zellen, die der Makrophagen-Zelllinie abstammen, nachzuweisen ist<sup>12, 64</sup>, als eine wichtige Besonderheit der Hyalozyten dar.

Wie unter 3.2.2.1.3 dargestellt, wurde in den von uns durchgeführten Versuchen diese Eigenschaft für die Hyalozyten aus menschlichen Spender-Augen bestätigt. Dies lieferte einen wesentlichen Unterschied zu den meisten anderen Zellen, die der Makrophagen-Zelllinie angehören, und stellt somit eine wichtige Besonderheit der immunhistochemischen Markierung dieses Zelltypus dar.<sup>57</sup>

Wir konnten darüber hinaus in unseren Experimenten mit dem Antikörper Anti-CD-68 auch für die porkinen Hyalozyten diese Ergebnisse bestätigen. Weder bei den Hyalozyten auf den frisch präparierten Glaskörpern (vgl. Abb. 3.9 a) noch bei den kultivierten Zellen in PK und P3 (vgl. Abb. 3.8 e) zeigte sich ein Hinweis auf die Expression dieses Markers.

Eine weitere Eigenschaft der humanen Hyalozyten, die in vorhergehenden Arbeiten beschrieben wird, ist der Nachweis des Ca-bindenden Proteins S 100<sup>57, 58, 69</sup>, das auf zahlreichen Antigen-präsentierenden Zellen aus der Makrophagen-Zelllinie zu finden ist<sup>21, 22</sup>.

Bei den von uns mit menschlichen Hyalozyten durchgeführten Versuchen ließ sich die Reaktivität mit dem Antikörper Anti-S-100 teilweise bestätigen:

während bei nach Präparation direkt weiter kultivierten Zellen Markierungen Grad IV konstatiert wurden (vgl. Abb. 3.10 a, b), zeigte sich unter unveränderten Versuchsbedingungen bei Verwendung von nach der Lagerung bei -80°C aufgetauten humanen Zellen keinerlei Markierung (vgl. Abb. 3.10 c).

Bei den Versuchen mit porkinen Hyalozyten fanden wir in den Zellkulturen S 100 positive Zellen, unabhängig davon, ob es sich um aufgetaute oder durchgehend kultivierte Zellen handelte. Die Markierung Grad II in PK und P3 (vgl. Abb. 3.8 a, b) deutete auf eine gleichmäßige, jedoch geringe Expression dieses Markers hin. Im Gegensatz dazu zeigten sich die Hyalozyten auf den Objektträgern mit frisch präpariertem Glaskörper allesamt negativ für den Antikörper Anti-S-100 (vgl. Abb. 3.9 b).

Sowohl die variable Ausprägung der Intensität der Anfärbung der porkinen Zellen in PK und P3 als auch die fehlende Markierung bei den im GK-Gerüst liegenden Hyalozyten mit Anti-S-100 unterstützt die Vorstellung einer zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich starken Ausprägung des gesuchten Markers. Bereits die Arbeitsgruppen von Lazarus et al.<sup>57</sup> und Saga et al.<sup>78</sup> vermuten in ihren Arbeiten eine variable Expression der Epitope bei den Hyalozyten, die abhängig vom Stadium der Differenzierung beziehungsweise der Exposition von modulierenden Signalen in der Umgebung der Zellen sind, weshalb sie – wie von uns durchgeführt – Untersuchungen unter verschiedenen Aktivitätszuständen fordern.

Bei korrekt durchgeführter Methodik mit entsprechenden gültigen Positivkontrollen (vgl. Abb. 3.6 a-c) und dem gleichmäßigen Einwirken der Antikörper-Lösung auf dem gesamten Präparat erklärt eine Veränderung der ultrastrukturellen Charakteristika und damit verbundenen immunhistochemischen Eigenschaften der einzelnen Zellen dieses Phänomen.

Erwähnenswert ist hierzu die Arbeit von Nishitsuka et al.: in dieser Studie wurden porkine Hyalozyten, die bis zur Passage 50 kultiviert worden waren, auf ihre HA-Produktion durch Zytokinstimulation hin untersucht. Die Autoren berichten in diesem Zusammenhang über den gänzlich fehlenden Nachweis von S 100 bei den verwendeten Hyalozyten aus Schweineaugen.<sup>68</sup>

Die grundsätzliche Problematik der Charakterisierung der Hyalozyten abhängig vom jeweiligen Funktionszustand beschreiben auch Kohno et al. in ihrer Arbeit. Die Autoren

heben die wichtige Rolle der Hyalozyten bei der Entstehung von epiretinalen Membranen hervor, weisen jedoch auf die Schwierigkeit der eindeutigen immunhistochemischen Markierung der 'transdifferenzierten' Zellen hin.<sup>53</sup>

Allgemein konnten unsere Ergebnisse der Immunmarkierungen der Hyalozyten in Versuchsgruppe I mit den Antikörpern Anti-CD-68 und Anti-S-100 einige wesentliche Erkenntnisse vorangehender Arbeiten bestätigen. Trotzdem warf die unterschiedliche Expression der Marker in verschiedenen Kulturphasen neue Fragen auf, welche die Verwendung der Marker zur eindeutigen Identifizierung der einzelnen Zellen schwierig erscheinen lassen.

Auch die Resultate unserer Immunmarkierungen mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 zeigten sowohl unterschiedliche Eigenschaften der jeweiligen humanen und porkinen Hyalozyten als auch unterschiedliche Resultate abhängig vom Aktivitätszustand der Zellen auf:

bei den porkinen Hyalozyten ließ sich bereits in den Primärkulturen eine Markierung Grad IV beobachten, die eine ausgeprägte Expression des Epitops zeigte (vgl. Abb. 3.8 c). Bei den Zellen der Passage 3 waren sowohl bei aufgetauten als auch bei durchgehend kultivierten Hyalozyten mit Grad V nahezu alle Zellen auf dem Präparat kräftig angefärbt (vgl. Abb. 3.8 d), so dass der Antikörper Anti-S-100-A2 als charakteristisch für die porkinen Hyalozyten in Zellkultur gesehen werden kann.

Die Hyalozyten auf den auf Objektträger gezogenen GK zeigten sich hingegen negativ für den Antikörper Anti-S-100-A2 (vgl. Abb. 3.9 c). Wie bereits für den Antikörper Anti-S-100 erläutert, weist dieses Phänomen auf Veränderungen der ultrastrukturellen und histochemischen Besonderheiten der Zellen hin. Die Expression von S-100-Proteinen kann Veränderungen von Enzymaktivitäten sowie Zellwachstum und -differenzierung aufzeigen<sup>21</sup>.<sup>22</sup> So könnten die Hyalozyten im Zuge der stattgefundenen Veränderung der Zellcharakteristika von der runden in die 'fibroblasten-artige' Form (vgl. Abb. 3.1 b, 3.2 a) auch Veränderungen in der Stoffwechselaktivität wie zum Beispiel die Produktion extrazellulärer Matrix ausbilden, was sich im neu aufgetretenen Nachweis des S 100 A2 Epitops in PK und P3 widerspiegelt.

Einige Autoren berichten, dass sich beim Krankheitsbild der proliferativen Vitreoretinopathie (PVR) in den gebildeten periretinalen Membranen 'fibroblasten-artige' Zellen finden lassen, die vermutlich aus metaplastischen Hyalozyten hervorgegangen sind. Diese Zellen produzieren im Rahmen dieses pathophysiologischen Vorgangs Extrazellulärsubstanz und lösliche Proteine.<sup>43, 47</sup>

Obwohl auch bei den humanen Hyalozyten von solchen Veränderungen im Laufe des Wachstums auszugehen ist,<sup>30 - 32, 34, 57, 83, 84</sup> waren in unseren Experimenten bei den Zellkulturen der P3 – bei korrekt durchgeführten Positivkontrollen (vgl. Abb. 3.6 c) – keinerlei Markierungen mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 nachzuweisen. Da bei diesen Versuchen jeweils nur aufgetaute Zellen verwendet wurden, ist hier eine Veränderung der Hyalozyten zum Beispiel durch den Vorgang des Einfrierens und ein eventueller Verlust des Epitops in Erwägung zu ziehen.

Die Ergebnisse bei Testung des Antikörpers Anti-S-100-A2 zeigen entweder grundsätzlich verschiedene Charakteristika bei menschlichen und porkinen Hyalozyten auf oder weisen zumindest auf ein unter identischen Versuchsbedingungen unterschiedliches Verhalten der jeweiligen Zellen hin.

Bei keinem der Versuche mit den auf Objektträgern gezogenen Glaskörpern zeigte sich eine Veränderung der Resultate durch die unter 2.2.3.1.1 beschriebene Vorbehandlung mit Hyaluronidase. Die gewünschte Wirkung der Lösung der Hyalozyten aus dem GK-Gerüst durch eine derartige Vorbehandlung und das daraus resultierende Freiliegen der Epitope stellte somit für unsere Experimente keinen praktischen Nutzen dar.

#### 4.2.1.2 Zellen des retinalen Pigmentepithels – porkine und humane Zellkulturen

Im Gegensatz zu den Hyalozyten, deren zellulärer Ursprung und exakte physiologische sowie pathophysiologische Rolle noch nicht vollständig geklärt sind, bestehen über die Zellschicht des retinalen Pigmentepithels weitgehend konkrete Erkenntnisse. So dienten uns die RPE-Zellen als Vergleichs- und Referenzgruppe, wir führten mit ihnen die immunhistochemischen Markierungen unter denselben Bedingungen durch.

Die Zellen des RPE weisen sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch Ähnlichkeiten mit mononukleären Phagozyten auf.<sup>25, 37, 93</sup>

Die eindeutige Markierung Grad V der humanen RPE-Zellen der Passage 3 (vgl. Abb. 3.12 a) bei Verwendung des Antikörpers Anti-CD-68 in unseren Experimenten bestätigte diese Eigenschaft und stellte ein eindeutiges Unterscheidungsmerkmal zu den humanen Hyalozyten-Kulturen dar, bei denen das Epitop CD 68 nicht nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 3.10 e).

Für die porkinen RPE-Zellen ließ sich diese Eigenschaft nicht bestätigen (vgl. Abb. 3.11 g). In diesem Fall können Unterschiede der Expression der Epitope der RPE-Zellen von Mensch und Schwein den fehlenden Nachweis von CD 68 bei den porkinen RPE-Zellen erklären.

So berichten Johnsen et al. in ihrer Arbeit über Stammzellen im CB-Epithel über deutliche Unterschiede der Resultate ihrer Untersuchungen bei Mensch und Maus, weshalb sie die Übertragung von Forschungsergebnissen von einer auf eine andere Spezies kritisch sehen.<sup>48</sup>

Elnert et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Expression des Antigens CD 68 bei humanen RPE-Zellen. Die Autoren beschreiben einen verstärkten Nachweis von CD 68 bei der Weiterkultivierung der Zellen. Sie begründen dies durch eine Steigerung der phagozytotischen Eigenschaften der Zellen *in vitro*, wie diese zum Beispiel auch bei Makrophagen *in vitro* beobachtet wird.<sup>25</sup>

Im Hinblick auf diese Erkenntnisse einer sich verstärkenden Expression des Markers bei humanen Zellen könnte ein bei porkinen RPE-Zellen eventuell erst bei der Weiterkultivierung über die Passage 3 hinaus erstmaliges Auftreten des Markers die fehlende Markierung unserer porkinen RPE-Kulturen mit Anti-CD-68 erklären.

Für die Unterscheidung der porkinen Zelltypen untereinander hat der AK Anti-CD-68 jedoch keine Bedeutung.

Bei Verwendung des AK Anti-S-100, dessen Markierung vor allem für die humanen Hyalozyten als charakteristisch angegeben wird<sup>57</sup>, ließ sich bei den humanen RPE-Zellen keine Markierung finden (vgl. Abb. 3.12 b). Somit lässt sich – trotz der nicht einheitlichen Ergebnisse der S 100 Markierungen der humanen Hyalozyten in unseren Versuchen (siehe 3.2.2.1.3) – auch hier wieder eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen den humanen Hyalozyten und RPE-Zellen zeigen.

Auch bei den porkinen Zellkulturen zeigten die Ergebnisse bei Verwendung des Antikörpers Anti-S-100 Unterschiede der RPE-Zellen zu den Hyalozyten und den Zellen des CB-Epithels: bei den Zellen des RPE waren weder in PK noch in P3 markierte Zellen auf den Präparaten zu finden (vgl. Abb. 3.11 d, e).

Für RPE-Zellen aus Rinderaugen berichten Lazarus et al. über den fehlenden Nachweis der S 100 Epitope. Die Autoren untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss von Faktoren, die – von Hyalozyten synthetisiert und sezerniert – hemmenden Einfluss auf die Proliferation von RPE-Zellen haben. Der Antikörper Anti-S-100 dient in diesen Versuchen als Marker zur Unterscheidung von Hyalozyten und RPE-Zellen, die Hyalozyten werden hier als S 100 positiv, RPE-Zellen und CB-Epithel-Zellen als eindeutig negativ beschrieben.<sup>58</sup>

Auch BenEzra et al. untersuchten in ihrer Arbeit S 100 positive Strukturen in der humanen Retina in Gewebsschnitten. Es konnten am gesunden Auge keine relevanten Hinweise für die Expression von S 100 gefunden werden. Lediglich an erkrankten Augen ließen sich mit dem Antikörper Anti-S-100 markierte Zellen finden. Die Autoren vermuteten, dass die Müller-

Zellen bei pathologischen Vorgängen Funktionen ähnlich derer der S 100 positiven lymphoiden Gewebe übernehmen, und dies den vermehrten Nachweis von S 100 erklärt. Für das RPE zeigte sich keine Markierung mit dem Antikörper Anti-S-100.<sup>10</sup>

Im Gegensatz dazu weisen Noda et al. in ihren Versuchen auf die Reaktivität mit dem Antikörper Anti-S-100 und Zytokeratin bei RPE-Zellen aus Rinderaugen hin.<sup>69</sup>

Die Resultate der von uns durchgeführten Immunmarkierungen mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 machten klar, dass dieser Antikörper keine Möglichkeit für die Unterscheidung von porkinen Hyalozyten und RPE-Zellen bietet. Wie bei den Hyalozyten zeigte sich bei den RPE-Zellen eine starke Anfärbung des Großteils der Zellen in PK und P3 (vgl. Abb. 3.11 a, b, c), was auf deutliche Veränderungen von Stoffwechselaktivität sowie Zellwachstum und -differenzierung hindeuten kann<sup>21, 22</sup>. Somit ist zwar ein wichtiges Charakteristikum der porkinen RPE-Zellen aufgezeigt, jedoch bietet sich dadurch keine Möglichkeit der immunhistochemischen Unterscheidung zwischen porkinen Hyalozyten und RPE-Zellen.

Für die humanen RPE-Zellen hingegen konnte mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 keine Markierung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.12 c). Somit entsprachen auch hier die Versuchsergebnisse denen der humanen Hyalozyten bei Testung des Antikörpers Anti-S-100-A2 (vgl. Abb. 3.10 d). Zur Identifizierung von humanen Hyalozyten und RPE-Zellen hat dieser Antikörper demnach keine Bedeutung.

Wie bereits bei den humanen Hyalozyten erläutert, muss grundsätzlich auch eine Veränderung der immunhistochemischen Eigenschaften der Zellen im Laufe der Passagen beziehungsweise durch den Vorgang des Einfrierens (siehe 2.2.1.6) in Erwägung gezogen werden. Bei den Immunmarkierungen der Versuchsgruppe I mit porkinen Zellkulturen sowie den Markierungen der humanen RPE-Zellen mit Anti-CD-68 zeigten sich jedoch keine Veränderungen der Resultate durch den Vorgang des Einfrierens (siehe 3.2.2). Da bei geprüfter Funktionsfähigkeit des Antikörpers (vgl. Abb. 3.6 c) sowohl bei den Hyalozyten als auch bei den RPE-Zellen von menschlichen Spendern keine Reaktion mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 nachgewiesen werden konnte, ist hier ein grundsätzliches Fehlen beziehungsweise ein erst zu späterem Zeitpunkt erstmaliges Auftreten des Epitops wahrscheinlich.

In diesem Falle würden sich diesbezüglich grundlegende Unterschiede zwischen porkinen und humanen Zellen zeigen, die eine direkte Übertragung der Versuchsergebnisse auf die jeweils andere Spezies kritisch erscheinen lassen.

#### 4.2.1.3 Zellen des Ziliarkörper-Epithels – porkine Zellkulturen, porkine und humane Gewebsschnitte

Der Bereich des CB-Epithels ist seit einiger Zeit Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten. Man fand hier eine potentielle retinale Nerven-Vorläuferzelle mit Stammzeleigenschaften und der Fähigkeit, *in vitro* neue Neuronen und Glia-Zellen entstehen zu lassen.<sup>38, 48, 61, 66, 94</sup>

In unserer Arbeit sollten vor allem über die nicht pigmentierte Zellschicht (NPE) des CB-Epithels neue Erkenntnisse gewonnen werden. Sowohl die Möglichkeit einer Identifizierung der NPE-Zellen in den Zellkulturen als auch der Vergleich mit den porkinen Hyalozyten und RPE-Zellen sowie den Paraffinpräparaten sollten untersucht werden.

Bei Verwendung des Antikörpers Anti-CD-68 ließen sich weder bei den porkinen Zellkulturen des CB-Epithels noch bei den humanen und porkinen Paraffinschnitten positive Markierungen finden (vgl. Abb. 3.13 f, 3.14 a, 3.15 d).

Diese Resultate der Immunmarkierungen mit Anti-CD-68 wären durch den neuroepithelialen Ursprung der Zellen zu erklären.<sup>20, 48, 65</sup> Denn das Epitop, das mit dem Antikörper Anti-CD-68 markiert wird, ist in der Regel auf Zellen, die der Monozyten-Linie abstammen, zu finden.<sup>57,</sup>

<sup>64</sup>

Bezüglich des Nachweises des S-100-Epitops bei Zellen des CB-Epithels wurden bereits von einigen Autoren Untersuchungen durchgeführt:

so weisen Smyth et al. in ihrer Arbeit mit Kaninchen-Zellen auf die Eignung des Antikörpers Anti-S-100 zur Identifizierung von Zellen des CB-Epithels hin. Die Autoren erklären, dass aufgrund des Ursprungs der epithelialen Zellen von der Neuralplatte deren Expression von S 100 ein Unterscheidungsmerkmal zu den Stroma-Zellen darstellt.<sup>89</sup>

Auch Kitada et al. untersuchten in ihrer Arbeit die Reaktivität von Anti-S-100 mit CB-Epithel-Zellen von Mensch und Kaninchen. Bei ihren Untersuchungen stellten sie eine starke Markierung des NPE bei relativ schwächerer Markierung im PE fest. Die Stroma-Zellen des CB zeigten sich in ihren Experimenten negativ für Anti-S-100. Grundsätzlich wurde über eine schwächere Reaktivität beim Kaninchen im Vergleich zum menschlichen Gewebe berichtet.<sup>51</sup>

Die Autoren Iwanaga et al. stellten in ihrer Arbeit die Markierung mit dem Antikörper Anti-S-100 als Unterscheidungsmerkmal zwischen NPE- und PE-Zellen dar. In den durchgeführten Untersuchungen an menschlichen Feten zeigte sich eine fehlende Markierung der PE-Schicht bei nachgewiesener Immunreaktivität der NPE-Zellschicht.<sup>44</sup>



Lazarus et al. berichteten hingegen in ihrer Arbeit über die grundsätzlich fehlende Markierung mit Anti-S-100-Antikörpern an Zellen des CB-Epithels aus Rinderaugen.<sup>58</sup>

In unseren Versuchen konnte bei den humanen Paraffinschnitten die eindeutige Markierung der NPE-Schicht des CB-Epithels mit dem Antikörper Anti-S-100 bestätigt werden (vgl. Abb. 3.15 a, b).

Der Nachweis des S-100-Epitops bei Zellen des CB-Epithels im humanen Gewebsschnitt stellte eine Gemeinsamkeit mit den humanen Hyalozyten-Kulturen dar (vgl. Abb. 3.10 a, b), die sich durch die Expression dieses Epitops von den humanen RPE-Zellkulturen (vgl. Abb. 3.12 b) unterscheiden ließen.

Bei den porkinen Paraffinschnitten hingegen zeigten sich das CB-Epithel und -Stroma negativ für Anti-S-100 (vgl. Abb. 3.14 b), erst bei den Zellen in Kultur ließen sich positive Markierungen Grad I nachweisen (vgl. Abb. 3.13 e). Das Fehlen von S 100 positiven Zellen bei den CB-Epithel-Zellen im Gewebsschnitt und die im Gegensatz dazu positiven Zellen in PK und P3 (vgl. Abb. 3.13 e) zeigten hier eine Änderung der immunhistochemischen Eigenschaften dieser Zellen im Verlauf.

So bestätigen sich in unseren Versuchen bereits die von Kitada et al. beschriebenen Unterschiede der Ausprägung der Epitope bei den unterschiedlichen Spezies.<sup>51</sup>

Somit lieferten diese Ergebnisse aus der Versuchsreihe I bei Testung des Antikörpers Anti-S-100 zwar Hinweise auf Gemeinsamkeiten von Zellen des CB-Epithels mit den Hyalozyten und zeigten Unterschiede zu den RPE-Zellen auf, trotzdem kann der Antikörper Anti-S-100 nicht zur endgültigen Unterscheidung und genaueren Charakterisierung der NPE-Zellschicht beitragen.

Für den Antikörper Anti-S-100-A2 ließen sich in unseren Versuchen bei den porkinen Zellkulturen ganz eigene Charakteristika feststellen. So war hier nur ein Teil der Zellen angefärbt, die markierten Zellen lagen zumeist in kleinen Gruppen vor. Auch handelte es sich bei den markierten Zellen zumeist um die runden beziehungsweise hexagonalen Zellen mit größerem Zellkörper im weniger dichten Wachstum. Die länglichen, 'fibroblasten-artigen' Zellen zeigten sich nur selten angefärbt (vgl. Abb. 3.13 a-d). Somit zeichnete sich bei diesen Zellkulturen ein Zelltyp ab, der sich sowohl durch die Ausprägung des Epitops S 100 A2 als auch durch die morphologischen Charakteristika von den anderen Zellen unterschied. Von einigen Autoren werden die Zellkörper der CB-Zellen als hexagonal beschrieben<sup>51, 89</sup>. So könnten mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 zu diesem Zeitpunkt besonders stoffwechselaktive Zellen des CB markiert worden sein<sup>21, 22</sup>. Möglich wäre jedoch auch, dass es sich bei den markierten Zellen um momentan gerade aktive Zellen mit zu diesem

Zeitpunkt entsprechender morphologischer Gestalt handelt. Die definitive Identifizierung eines bestimmten Zelltyps kann somit nicht sicher gezeigt werden.

Bei den Gewebsschnitten hingegen ließen sich weder bei den porkinen noch bei den humanen Präparaten S 100 A2 positive Strukturen im CB-Epithel finden (vgl. Abb. 3.14 c, 3.15 c). Dies beweist bei den porkinen Zellen eindeutig, dass die Ausprägung dieses Epitops erst später im Zuge des Wachstums und der Vermehrung der Zellen auftritt.

Dieses Phänomen ließ sich auch bei den Markierungen der porkinen Hyalozyten mit Anti-S-100-A2 feststellen. Auch hier waren die Hyalozyten im GK-Gerüst noch nicht markiert (vgl. Abb. 3.9 c), erst in Zellkultur schienen Veränderungen der Stoffwechsellaktivität aufzutreten, die zur Ausprägung des Epitops S 100 A2 führen (vgl. Abb. 3.8 c, d).

So zeigte die Markierung mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 eine Reaktivität der Zellkulturen aus dem CB-Epithel, die sie eindeutig von den Hyalozyten- und RPE-Zellkulturen unterschied. Trotzdem war – vor allem, da in den Gewebsschnitten keine Markierung mit Anti-S-100-A2 in Epithel und Stroma zu finden war – durch diesen Antikörper die definitive Identifikation eines Zelltyps in Kultur nicht möglich.

#### 4.2.1.4 Charakterisierung der Zellen durch kommerziell erhältliche Antikörper – Zusammenfassung Versuchsgruppe I

Die Experimente mit den von uns in Versuchsgruppe I verwendeten Antikörpern brachten wichtige Erkenntnisse für die Charakterisierung der Zellen aus dem GK-Raum.

Eine Eignung als spezifischer Identifikationsmarker für die jeweiligen Zelltypen kann jedoch keinem der getesteten Antikörper zugesprochen werden.

Für die humanen Zellkulturen lieferte der Nachweis des Epitops S 100 bei den Hyalozyten (vgl. Abb. 3.10 a, b) in einem Teil der Versuche ein Unterscheidungsmerkmal zu den RPE-Zellen (vgl. Abb. 3.12 b), wie dies von Lazarus et al. beschrieben wird <sup>57</sup>.

Von besonderem Interesse war die auf den humanen Gewebsschnitten gezeigte Expression von S 100 der NPE-Zellschicht (vgl. Abb. 3.15 a, b). Dies zeigt Gemeinsamkeiten von Zellen der NPE-Schicht mit den Hyalozyten, wie sie von Rittig et al. bei ihren Versuchen an Primaten-Augen in Bezug auf eine Beteiligung der beiden Zellen an der Produktion von HA dargestellt wird <sup>76</sup>.

Zwar bestätigte sich in unseren Versuchen für die porkinen Präparate der Nachweis von S 100 für die Zellkulturen der Hyalozyten (vgl. Abb. 3.8 a, b) und Zellen des CB-Epithels (vgl. Abb. 3.13 e) bei S 100 negativen RPE-Zellkulturen (vgl. Abb. 3.11 d, e), jedoch zeigten sich

sowohl die Hyalozyten im GK-Gerüst (vgl. Abb. 3.9 b) als auch die NPE-Schicht im Paraffinschnitt (vgl. Abb. 3.14 b) ebenfalls negativ für den Antikörper Anti-S-100. Auch konnte die Expression von S 100 der humanen Hyalozyten-Kulturen nicht in allen Wiederholungsversuchen bestätigt werden (vgl. Abb. 3.10 a, b, c). Zudem stellt auch die Tatsache, dass bei den porkinen Hyalozyten und Zellen des CB-Epithels immer nur ein gewisser Anteil der auf dem Präparat befindlichen Zellen markiert ist (vgl. Abb. 3.8 a, b, Abb. 3.10 a, b), für den Antikörper Anti-S-100 die Funktion als zellspezifischen Marker in Frage.

Zuletzt kann der Antikörper Anti-S-100 auch dem Auffinden der NPE-Zellen in den vorliegenden Mischkulturen mit unterschiedlichen Zellen nicht gerecht werden.

Der Antikörper Anti-S-100-A2 zeigte sich für die verwendeten humanen Zellkulturen (vgl. Abb. 3.10 d, 3.12 c) und Gewebsschnitte (vgl. Abb. 3.15 c) aufgrund der fehlenden Markierung von Zellen als ungeeignet für die Ziele unserer Arbeit der näheren Charakterisierung der GK-Zellen.

An den verschiedenen porkinen Zellkulturen hingegen zeigte sich mit Anti-S-100-A2 eine typische Markierung (vgl. Abb. 3.8 c, d, Ab. 3.11 a-c, 3.13 a-d), doch auch hier schränkt die sich im Zellkulturverlauf verstärkende Ausprägung des Epitops die Nutzung dieses Antikörpers ein.

In den Zellkulturen war mit Anti-S-100-A2 keine Unterscheidung zwischen Hyalozyten und RPE-Zellen möglich und vor allem wegen der fehlenden Markierung der Hyalozyten im GK-Gerüst (vgl. Abb. 3.9 c) kann dieser Antikörper nicht als generell charakteristisch für Hyalozyten bezeichnet werden.

Bei den Kulturen der Zellen des CB-Epithels zeigten die mit dem Antikörper Anti-S-100-A2 markierten Zellen zum großen Teil morphologische Besonderheiten, die sie von den umliegenden Zellen unterschieden (vgl. Abb. 3.13 a-d). Dies kann einen Hinweis auf die Möglichkeit der spezifischen Markierung eines ganz bestimmten Zelltypus mit Anti-S-100-A2 darstellen. Die genauere Charakterisierung der gefärbten Zellen war in diesem Fall jedoch nicht möglich und vor allem aufgrund der fehlenden Markierung der NPE-Schicht im Paraffinschnitt durch diesen Antikörper (vgl. Abb. 3.14 c) bleibt die Annahme, dass es sich bei den markierten Strukturen um NPE-Zellen handelt und hiermit eine weitere Gemeinsamkeit mit den Hyalozyten gezeigt wird, spekulativ.

Mit dem Antikörper Anti-CD-68 ließen sich für die humanen Zellkulturen deutliche Unterschiede zwischen Hyalozyten (vgl. Abb. 3.10 e) und RPE-Zellen aufzeigen (vgl. Abb. 3.12 a), die vor allem in Kombination mit den entsprechenden Resultaten mit Anti-S-100

(vgl. Abb. 3.12 b, 3.10 a, b) zur Unterscheidung der beiden Zelltypen beitragen konnten. Diese Ergebnisse ließen sich jedoch für die porkinen Präparate nicht bestätigen, der Antikörper Anti-CD-68 konnte aufgrund der fehlenden Markierung am Gewebe aus Schweineaugen nicht zur weiteren Identifizierung der einzelnen Zellen beitragen (vgl. Abb. 3.8 e, Abb. 3.9 a, Abb. 3.11 f, g, Abb. 3.13 f, Abb. 3.14 a).

Bei allen getesteten Antikörpern dieser Versuchsgruppe weisen die Ergebnisse auf Schwierigkeiten der Zellcharakterisierung bedingt durch die Veränderung der immunhistochemischen Eigenschaften der Zellen im Verlauf des Wachstums beziehungsweise durch die unterschiedlichen Resultate der Markierungen bei Gewebsschnitten und Zellkulturen hin.

Mit keinem der Antikörper war eine eindeutige Identifizierung der NPE-Zellen in den Zellkulturen aus dem CB-Epithel möglich.

Des Weiteren zeigten sich in dieser Versuchsreihe zahlreiche Unterschiede zwischen humanem und porkinem Gewebe, die eine grundsätzliche Übertragung der Resultate von Versuchen mit Schweineaugen auf menschliche Augen kritisch erscheinen lassen.

#### 4.2.2 Versuchsgruppe II: Antikörper, hergestellt durch Immunisierung von Versuchstieren: Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII

Im Folgenden werden die Ergebnisse der immunhistochemischen Markierungen in Versuchsgruppe II diskutiert. Einen Überblick der Resultate dieser Versuchsgruppe geben die Tabellen 3.5 und 3.6.

##### 4.2.2.1 Grundsätzliche Eigenschaften

Ein Antikörper, der Hyalozyten im Gewebe spezifisch markiert, wäre wegen der fehlenden Möglichkeit der eindeutigen Identifizierbarkeit dieses Zelltyps aufgrund morphologischer und immunhistochemischer Charakteristika<sup>57, 63, 68, 79</sup> ein sehr hilfreiches Instrument bei wissenschaftlichen Arbeiten. So könnte bei pathophysiologischen Prozessen im Auge die Beteiligung der unterschiedlichen Zelltypen besser geklärt werden, was den ersten Schritt zu neuen Lösungsansätzen darstellen könnte. Auch wäre im Hinblick auf regenerative Therapieansätze eine eindeutige Identifizierung der Hyalozyten zur Detektion und Sortierung dieser Zellen von großer Wichtigkeit.

Für diese Arbeit wurde in Kooperation mit der Firma Davids Biotechnologie (siehe [www.davids-bio.de](http://www.davids-bio.de)) der Versuch unternommen, einen hyalozyten-spezifischen Antikörper zu generieren. Durch Immunisierung von Kaninchen und Mäusen mit Schweine-Hyalozyten wurden zwei polyklonale Antikörper, Anti-H/PI und Anti-H/PII, hergestellt (siehe 2.1.3.5) und anschließend an den verschiedenen porkinen Zellkulturen und Geweben hinsichtlich Sensitivität und Spezifität getestet.

Bei allen Zellkultur-Präparaten zeigte sich die Markierung mit dem Antikörper Anti-H/PII grundsätzlich intensiver als die Markierung bei Verwendung des Antikörpers Anti-H/PI. Dafür könnte ein höherer Antikörper-Titer in den verwendeten Seren verantwortlich sein. Jedoch wurde bei den einzelnen Versuchstieren von der Firma Davids Biotechnologie eine Titer-Bestimmung des jeweiligen Antikörpers durchgeführt und anschließend in den Vorversuchen die am besten geeignete Verdünnung ermittelt. Wahrscheinlich ist deshalb, dass die stärkere Markierung beim AK Anti-H/PII durch eine größere Anzahl markierter Epitope an den jeweiligen Zellen und Strukturen hervorgerufen wird. Bei gleichen Vorgängen der Immunisierung bei der Herstellung der Antikörper könnte in den Mäusen (AK Anti-H/PII) ein Gemisch an Antikörpern beziehungsweise ein polyklonaler Antikörper mit einer Reaktivität an zahlreicheren Zellmarkern als dies bei der Immunisierung der Kaninchen (AK Anti-H/PI) der Fall war, entstanden sein. Vor allem die Tatsache, dass sich in unseren Versuchen bei den RPE-Zellkulturen in Primärkultur unterschiedliche Reaktionen bei Verwendung der beiden Antikörper zeigten (vgl. Abb. 3.18 a, c), bestätigt die Theorie, dass die beiden Antikörper mit verschiedenen Zellstrukturen reagieren beziehungsweise dass der Antikörper Anti-H/PII an eine größere Anzahl von unterschiedlichen Epitopen bindet.

Auf den Gewebsschnitten und Präparaten mit den auf Objektträger gezogenen Glaskörpern war dieser Unterschied der Intensität der Anfärbung nicht zu erkennen (vgl. Abb. 3.17 a-e, 3.20 a-d). Hier wies auch der Antikörper Anti-H/PI eine sehr starke Anfärbung von Zellen und Strukturen auf. Es ist anzunehmen, dass bei den Hyalozyten auf dem GK-Cortex beziehungsweise den CB-Epithel-Zellen im Gewebsschnitt auf der im Vergleich zu den Zellen in Kultur geringeren Zelloberfläche eine so große Dichte der entsprechenden Epitope vorhanden ist, die die intensive Anfärbung bei beiden Antikörper-Seren erklärt.

Hier zeigte sich, dass die Ergebnisse bei Verwendung der beiden Antikörper von den durch die Methodik bedingten minimalen Unterschieden in der Einwirkzeit beziehungsweise -intensität beeinflusst waren. Bei einer weiteren Handhabung dieser Antikörper könnte eine Änderung beziehungsweise Anpassung der Methodik zu gleichmäßigeren Ergebnissen führen.

#### 4.2.2.2 Porkine Hyalozyten – Zellkulturen und Glaskörper

Mit beiden Antikörpern war eine eindeutige Markierung der Hyalozyten möglich. Der Anteil der angefärbten Zellen zeigte sich bei den Primärkulturen und den Zellen der Passage 3 mit Grad V vergleichbar hoch (vgl. Abb. 3.16 a-d), das markierte Epitop war demnach bereits in den Zellen der PK stark ausgeprägt.

Ein wesentlicher Unterschied zu den Versuchen mit den Hyalozyten unter Verwendung der Antikörper der Versuchsgruppe I zeigte sich jedoch dahingehend, dass mit den Antikörpern Anti-H/PI und Anti-H/PII der Versuchsgruppe II auch bei den Hyalozyten auf den GK-Präparaten positive Reaktionen nachzuweisen waren (vgl. Abb. 3.17 a-c) – eine solche Markierung der Hyalozyten auf dem Glaskörper-Cortex war mit den Antikörpern Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 nicht gelungen (vgl. Abb. 3.9 a-c). So erfüllten beide Antikörper der Versuchsgruppe II diesbezüglich die grundsätzliche Erwartung der Markierung von Hyalozyten in verschiedenen Wachstumsphasen.

Es stellt sich jedoch die Frage nach dem Grund für den mit Grad II im Vergleich zu den Zellkulturen in PK und P3 geringeren Anteil an markierten Zellen auf den GK-Präparaten (vgl. Abb. 3.17 a). Grundsätzlich könnte der Unterschied zwischen markierten und unmarkierten Zellen in einer zu diesem Zeitpunkt unterschiedlichen metabolischen Aktivität der Zellen liegen. Gegen diese Begründung spricht die Verteilung der gefärbten Zellen. Nachdem diese jeweils in kleinen Gruppen von Zellen, die sich morphologisch nicht von den anderen Zellen unterscheiden, auftraten, muss hier eine Besonderheit der GK-Präparate im Hinblick auf die durchgeführte Methodik angeführt werden.

Im Gegensatz zu den Paraffinpräparaten mit Gewebsschnitten des Auges und den auf Glasplättchen gewachsenen Zellkulturen konnte bei den Glaskörpern auf Objektträgern aufgrund der unregelmäßigen Struktur der GK-Matrix und der relativen Dicke des Präparates der gleichmäßige Kontakt aller Zellen mit den einzelnen Reagenzien beim Färbvorgang nicht sicher gewährleistet werden. Dies stellt in diesem Fall die wahrscheinlichste Erklärung für die nicht markierten Zellen dar.

#### 4.2.2.3 Porkine Zellkulturen des retinalen Pigmentepithels

In der Versuchsgruppe II stellen bei den RPE-Zellkulturen vor allem die verschiedenen Ergebnisse von Zellen der PK und denen der P3 den bedeutsamsten Unterschied zu den Resultaten der Hyalozyten-Kulturen dar, bei denen sich schon in PK markierte Zellen zeigten (vgl. Abb. 3.16 a, c). Während für die Zellen des RPE mit beiden Antikörper-Seren in P3 Markierungen Grad V zu sehen waren (vgl. Abb. 3.18 b, d), ließen sich in der PK der RPE mit dem Antikörper Anti-H/PII nur schwache (vgl. Abb. 3.18 c), mit dem Antikörper Anti-H/PI keine Reaktionen (vgl. Abb. 3.18 a) nachweisen. Das erstmalige Auftreten von Markierungen bei Verwendung des Antikörpers Anti-H/PI beziehungsweise der verstärkte Nachweis bei Verwendung von Anti-H/PII in der P3 zeigen, dass die RPE-Zellen im Laufe des Wachstums Zelleigenschaften entwickeln, die bei den Hyalozyten durch die deutliche Markierung im GK-Gerüst sowie in Zellkulturen in PK und P3 (vgl. Abb. 3.16 a-d, Abb. 3.17 a-c) bereits von Beginn an nachzuweisen sind. Dieser deutliche Unterschied der Resultate der Markierungen von PK und P3 bei Hyalozyten und RPE-Zellen in dieser Versuchsgruppe zeigt eine Veränderung der immunhistochemischen Eigenschaften der RPE-Zellen, die in Verbindung mit der von uns beobachteten Veränderung der Morphologie in die längliche Zellform (vgl. Abb. 3.3 c, d, Abb. 3.4 a, b) steht. Diese wird von anderen Autoren sowohl bei der Kultivierung von RPE-Zellen *in vitro*<sup>3, 24, 101, 103, 106</sup> als auch bei pathophysiologischen Prozessen *in vivo*<sup>43, 50, 71, 102</sup> beschrieben.

#### 4.2.2.4 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels – Zellkulturen und Gewebsschnitte

Auch auf den Präparaten mit Zellen des CB-Epithels waren mit beiden Antikörpern der Versuchsgruppe II positive Reaktionen nachzuweisen, wobei der Vergleich von Gewebsschnitten und Zellkulturen besonders interessante Resultate erbrachte:

für beide Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII zeigte sich bei den Zellen der P3 eine Markierung Grad V (vgl. Abb. 3.19 b, d), wie sie in dieser Versuchsgruppe auch bei den Hyalozyten und RPE-Zellen in P3 konstatiert wurde (vgl. Abb. 3.16 b, d, Abb. 3.18 b, d). Bei den Zellen des CB-Epithels der PK wiesen lediglich die einzeln außerhalb des konfluenten Zellverbandes liegenden Zellen eine intrazytoplasmatische Markierung auf, die dichter aneinander liegenden Zellen hingegen stellten sich ohne Markierung dar, insgesamt wurde eine Markierung Grad I festgestellt (vgl. Abb. 3.19 a, c). Auf den Gewebsschnitten des porkinen Auges zeigte bei Testung beider Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII das CB-

Epithel im Bereich von pars plana und pars plicata eine Anfärbung der nicht pigmentierten Epithel-Schicht (vgl. Abb. 3.20 a-d).

Unter der Annahme, dass die aus diesem Bereich für unsere Zellkulturen präparierten Zellen (siehe 2.2.1.2) die im Gewebsschnitt nachgewiesenen antigenen Eigenschaften (vgl. Abb. 3.20 a-d) in der PK nicht verlieren, würden die durch die Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII markierten CB-Epithel-Zellen in PK (vgl. Abb. 3.19 a, c) den nicht pigmentierten Epithel-Zellen (NPE) entsprechen. Die nicht eindeutig markierten Zellen im dichten 'pflasterstein-artigen' Wachstum in der PK (vgl. Abb. 3.19 a, c) würden dann der pigmentierten Epithelschicht (PE) im Gewebsschnitt entsprechen. Jedoch kann bei der von uns durchgeführten Präparationsmethode das Vorliegen anderer Zellbestandteile in den Präparaten nicht sicher ausgeschlossen werden.

So kann die deutliche Markierung der NPE-Schicht des CB in den Gewebsschnitten mit beiden Antikörpern der Versuchsgruppe II (vgl. Abb. 3.20 a-d) verbunden mit dem Nachweis der markierten einzeln vorliegenden Zellen in der PK der Zellen des CB-Epithels (vgl. Abb. 3.19 a, c) auf ein vorliegendes gemeinsames Epitop mit den von diesen Antikörpern markierten Hyalozyten in ihrer Form im GK-Gerüst (vgl. Abb. 3.17 a-c) hinweisen. Dies wäre ein weiterer Hinweis für gemeinsame Charakteristika der Zellen der NPE-Schicht mit den Hyalozyten, wie dies zum Beispiel in Bezug auf die Produktion extrazellulärer Matrix vermutet wird <sup>11, 76</sup>.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die in dieser Versuchsgruppe bei den Zellen des CB-Epithels der P3 mit Grad V verstärkte Markierung der Zellen (vgl. Abb. 3.19 b, d) wäre eine Veränderung der immunhistochemischen Eigenschaften der sich zu gleichen Teilen weiter vermehrenden Zellen des CB-Epithels in Zellkultur, wie sie bereits bei den entsprechenden Resultaten der RPE-Zellkulturen in Versuchsgruppe II unter 4.2.2.3 geschildert wurden.

Da jedoch bei den Zellkulturen, die durch die von uns durchgeführte Präparation des CB-Epithels gewonnen wurden (siehe 2.2.1.2), von mehreren unterschiedlichen Zelltypen mit eventuell eigenen Wachstums- und Vermehrungstendenzen unter den angegebenen Kultivierungsbedingungen (siehe 2.2.1.4) ausgegangen werden muss <sup>20, 26, 27, 55</sup>, könnte sich das Verhältnis der einzelnen Zellen untereinander in den vorhandenen Mischkulturen in P3 bereits wesentlich geändert haben im Vergleich zu den Zellen der PK.

So ist es auch möglich, dass der in PK durch beide Antikörper markierte Zelltypus (vgl. Abb. 3.19 a, c) im weiteren Verlauf das Wachstum der anderen Zellen hemmt und so in P3 die dominante und fast ausschließlich vertretene Zellart darstellt, was sich entsprechend in der Markierung Grad V dieser Zellen in P3 zeigt (vgl. Abb. 3.19 b, d).



Gegen diese Theorie, dass es sich bei den von den Antikörpern Anti-H/PI und Anti-H/PII markierten Zellen in den Zellkulturen des CB-Epithels in PK und P3 um NPE-Zellen handelt, spricht, dass gerade für diese Zellen oft schwierige Kultivierungsbedingungen mit Dominieren der PE-Zellen beschrieben werden.<sup>20, 26, 27, 55</sup>

Auch spricht die mikroskopische Beobachtung des Wachstumsverlaufs der Zellen des CB-Epithels in unseren Versuchen (siehe 3.1.3), die ein reges Wachstum von dem Zelltypus, der sich in PK nicht markiert darstellte (vgl. Abb. 3.19 a, c), zeigte, gegen diesen Erklärungsversuch. So scheint auch hier, wie in unseren Versuchen gehäuft beobachtet, eine erst zu späterem Zeitpunkt verstärkte Expression des Epitops die unterschiedlichen Resultate der Immunmarkierungen mit den Antikörpern der Versuchsgruppe II an Zellen des CB-Epithels in PK und P3 zu erklären.

#### 4.2.2.5 Testung zweier hyalozyten-spezifischer Antikörper

##### – Zusammenfassung Versuchsgruppe II

Beide Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII erfüllten durch die eindeutige Markierung von Hyalozyten in den verschiedenen Phasen des Wachstums (vgl. Abb. 3.16 a-d, Abb. 3.17 a-c) eine wichtige Anforderung. Der Vergleich mit den Ergebnissen der Primärkulturen der RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels in dieser Versuchsgruppe, die jeweils nur schwache beziehungsweise vollständig fehlende Markierungen aufwiesen (vgl. Abb. 3.18 a, c, Abb. 3.19 a, c), bestätigte die starke Affinität beider Antikörper zu der Zellart der Hyalozyten.

Doch die Markierungen Grad V der P3 der CB-Epithel- und RPE-Zellkulturen (vgl. Abb. 3.18 b, d, Abb. 3.19 b, d) zeigen, dass mit diesen Antikörpern aufgrund antigener Eigenschaften dieser Zellen, die sich im Wachstumsverlauf veränderten, keine Unterscheidung zu den Hyalozyten mehr möglich war (vgl. Abb. 3.16 b, d).

Auch zur Identifizierung der Zellen des nicht pigmentierten CB-Epithels konnten die Antikörper nur bedingt beitragen. Zwar ließ sich in allen Versuchen die NPE-Schicht in den Gewebsschnitten eindeutig anfärben (vgl. Abb. 3.20 a-d) und durch den Nachweis dieses Epitops zeigten sich weitere Gemeinsamkeiten mit den Hyalozyten, die in allen Wachstumsphasen deutliche Markierungen mit den Antikörpern aus Versuchsgruppe II zeigten (vgl. Abb. 3.16 a-d, Abb. 3.17 a-c), doch auch hier war, wie unter 4.2.2.4 beschrieben, im weiteren Verlauf des Wachstums der Zellen in Kultur keine sichere Identifikation der jeweiligen Zellen mehr möglich.

Weiteren Aufschluss könnte ein Versuch der noch spezifischeren Präparation allein der NPE-Zellen bieten. Doch im Hinblick auf die Reaktion der Antikörper mit zahlreichen Zellen hätte eine gesicherte Markierung der NPE-Zellen in Kultur nur eine untergeordnete Rolle.

Im Vergleich lassen die von uns dargestellten sehr ähnlichen Resultate bei der Testung beider Antikörper der Versuchsgruppe II auf ein Vorliegen von Antikörpern, deren Reaktivität sich auf sehr ähnliche Epitope bezieht, schließen. Lediglich die grundsätzlich stärkere Reaktivität bei den Immunmarkierungen mit Zellkulturen (siehe 4.2.2.1) sowie die Markierung Grad I der RPE-Zellen in PK (vgl. Abb. 3.18 c) lassen beim AK Anti-H/PII eine Reaktivität mit zusätzlichen Epitopen im Vergleich mit dem AK Anti-H/PI vermuten. Wegen der fehlenden Markierung der RPE-Zellen in PK (vgl. Abb. 3.18 a) könnte dem AK Anti-H/PI dahingehend die bessere Eignung als hyalozyten-spezifischer Antikörper zugesprochen werden.

Die von uns beobachteten Veränderungen der Morphologie der Zellen im Wachstumsverlauf (siehe 3.1.1, 3.1.2, 3.1.3) spiegeln sich bei den Zellen des RPE und den Zellen des CB-Epithels in Veränderungen der immunhistochemischen Eigenschaften wider und zeigten damit die Grenzen für die von uns in Versuchsgruppe II getesteten Antikörper auf.

Ein weiterer Schritt zur besseren Identifizierung der Zellen in verschiedenen Phasen des Wachstums könnte die Testung eines eigens hergestellten monoklonalen Antikörpers darstellen.

### 4.3 Markierung der extrazellulären Matrix mit Alcianblau-Farbstoffen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Markierungen mit Alcianblau-Farbstoffen an porkinen Zellkulturen diskutiert. Einen Überblick der Resultate dieser Versuche gibt die Tabelle 3.7.

#### 4.3.1 Porkine Hyalozyten

Die Hyaluronsäure (HA) stellt das wichtigste Glykosaminoglykan (GAG) des GK dar. Normalerweise ist in allen GAG eine Sulfatgruppe an Sauerstoff oder Nitrogen gekoppelt, eine Ausnahme stellt hier die HA dar.<sup>83</sup>

Für die Produktion von HA werden die Hyalozyten verantwortlich gemacht:

Balazs stellte bereits 1954 fest, dass sich Hyalozyten im GK in Gebieten der höchsten HA-Konzentration befinden und schloss daraus deren Verantwortlichkeit für die HA-Produktion.<sup>5</sup>

Jacobson et al. stellten fest, dass die Hyalozyten über die für die HA-Produktion nötigen Enzyme verfügen.<sup>46</sup>

Weitere Studien zeigten, dass Hyalozyten große Mengen an HA produzieren<sup>45, 68, 72</sup>, die genaue Art der Absetzung der HA ist nach wie vor unklar.

Diese Beteiligung an der Synthese von GAG, insbesondere der HA, sollte in unseren Versuchen durch die Färbung von extrazellulärer Matrix (ECM) in den Zellkulturen mit Alcianblau-Farbstoffen verschiedener pH-Wert-Einstellungen gezeigt werden und zur weiteren Unterscheidung der einzelnen Zelltypen beitragen.

In unseren Experimenten zeigten sich nach Durchführung der Alcianblau-Färbung (siehe 2.2.3.2.2) mit pH-Wert 2,5 auf den Präparaten mit porkinen Hyalozyten eindeutig blau markierte interzelluläre Strukturen (vgl. Abb. 3.21 b, d). Dadurch war der allgemeine Nachweis extrazellulärer GAG, die um die Zellen herum zu finden waren, gelungen.

Die negativen Ergebnisse bei den Färbungen der Hyalozyten mit der Lösung des pH-Wertes 1,0 (vgl. Abb. 3.21 a) erlaubten nun die genauere Identifizierung der nachgewiesenen Matrix. Da mit der Lösung, die auf den pH-Wert von 1,0 eingestellt wurde, im hauptsächlichen sulfatierte GAG nachgewiesen werden, konnte dadurch geschlossen werden, dass es sich bei der extrazellulären Substanz in den Hyalozyten-Kulturen zum größten Teil um nicht sulfatierte GAG handeln musste.

Durch diese Ergebnisse ist davon auszugehen, dass es sich bei der nachgewiesenen ECM in unseren Hyalozyten-Zellkulturen hauptsächlich um HA handelt.

Durch den verstärkten Nachweis in den Gebieten des besonders dichten Wachstums (vgl. Abb. 3.20 c) bestätigt sich der Zusammenhang von Zelldichte und Menge der nachgewiesenen ECM. Die intensiven Anfärbungen in den Gebieten der Zellverdichtungen lassen hier einen besonders aktiven Stoffwechsel vermuten.

François et al. berichteten in ihren histochemischen Studien über die hohe metabolische Aktivität von Hyalozyten auch in Zellkultur und untersuchten bei den Zellen die Biosynthese von GAG und Kollagen-Vorläufern. Hierbei stellten sie bei den verwendeten Primär- und Subkulturen eine in den ersten 8 Tagen in Kultur steigende Produktion von GAG fest. Nach genauerer Differenzierung der Matrix ging die Arbeitsgruppe jedoch vom Vorliegen von hauptsächlich sulfatierten GAG aus, mit den in ihrer Arbeit durchgeführten Färbungen ließen sich weder intra- noch extrazellulär Markierungen finden. Auch wurde ein Teil der Versuche nach Vorbehandlung mit boviner Hyaluronidase durchgeführt. Der unveränderte Nachweis der hauptsächlich intrazellulär nachzuweisenden GAG bestätigte für François et al. das Fehlen von HA in den Zellkulturen.<sup>32</sup>

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen bei den von François et al. durchgeführten Markierungen an humanen Hyalozyten<sup>32</sup> konnte in einer Arbeit von Nishitsuka et al. bei porkinen Hyalozyten die Produktion von HA und deren Regulation durch Zytokine gezeigt werden: nach Herstellung von immortalisierten Hyalozyten-Kulturen durch Plasmid-Transfer wurde unter anderem mit Hilfe eines HA 'assay kit' die HA Produktion vor allem bei pathologischen Prozessen gezeigt.<sup>68</sup>

Die Tatsache, dass bei den Versuchen von François et al.<sup>32</sup> mit humanen Hyalozyten kein Nachweis von HA in vitro gelang, wird durch die Theorie von Bleckmann unterstützt, der bei den von ihm als Fibroblasten bezeichneten Zellen des GK in vitro eine Reduktion der Produktion von HA zugunsten sulfatierter Mukopolysaccharide (MPS) beschreibt.<sup>13</sup>

In unseren Versuchen führte die Vorbehandlung mit dem Enzym Hyaluronidase zu einer teilweisen Ablösung des Zellrasens sowie zu morphologischen Veränderungen der einzelnen Zellen (vgl. Abb. 3.22 a, b). Diese Veränderungen sind auf zellschädigende Wirkungen dieses Enzyms zurückzuführen. Auch die Menge der blau markierten extrazellulären Matrix zeigte sich bei der Farblösung mit pH-Wert 2,5 nach Hyaluronidase-Vorbehandlung vermindert (vgl. Abb. 3.22 b). So kann von einem teilweisen Verdau der ursprünglich vorhandenen Menge an HA ausgegangen werden, wobei dieser nicht ausreichend war, die gesamte Menge der gebildeten HA zu entfernen. Aufgrund dieser undifferenzierten Ablösung sowohl von Zellen als auch von ECM von den Glasplättchen ist die Eignung dieser Vorbehandlung zur genaueren Charakterisierung der gebildeten GAG in Frage zu stellen.

Der Nachweis von ECM mit der auf den pH-Wert 2,5 eingestellten Lösung (vgl. Abb. 3.21 b, c) bei fehlendem Nachweis von ECM bei Verwendung der Lösung mit pH-Wert 1,0 (vgl. Abb. 3.21 a) stellt eine wichtige Charakteristik der von uns untersuchten porkinen Hyalozyten dar.

#### 4.3.2 Porkine Zellen des retinalen Pigmentepithels

Auch für die Zellen des RPE ist eine Beteiligung an der Produktion von ECM in vivo und in vitro bekannt: als die wichtigsten von den RPE-Zellen produzierten GAG bei verschiedenen Spezies werden Heparansulfat (HS), Dermatan-sulfat (DS), Chondroitinsulfat (CS) und Hyaluronsäure (HA) beschrieben.<sup>18, 24, 91, 92</sup>

Hierbei variieren die Angaben der prozentualen Anteile der sezernierten Substanzen HS, DS und CS untereinander, wobei die HA bei den verschiedenen untersuchten Spezies sowohl in den Primär- als auch in Subkulturen den geringeren Anteil darstellte.<sup>18, 24, 91</sup>

Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Edwards et al. und Stramm et al. führten die relativ geringe Produktion an HA als Unterscheidungsmerkmal der RPE-Zellen zu Kontrollgruppen von choroidal-skleralen Fibroblasten, welche zu einem wesentlich größeren Prozentsatz HA produzieren, an.<sup>24, 91</sup>

In unseren Versuchen ließ sich bei den porkinen RPE-Zellen in P3 mit beiden Alcianblau-Lösungen extrazelluläre Matrix markieren: aufgrund der positiven Reaktionen sowohl bei der Lösung mit pH-Wert 2,5 als auch bei pH-Wert 1,0 (vgl. Abb. 3.23 a-d) kann es sich demnach bei den detektierten Substanzen sowohl um sulfatierte als auch um nicht sulfatierte GAG handeln (siehe 2.2.4.2.1).

Diese Resultate sind mit den von anderen Autoren dargestellten Erkenntnissen über die Produktion von GAG bei den RPE-Zellen gut zu vereinbaren.<sup>18, 24, 91, 92</sup>

Wie schon bei den Alcianblau-Färbungen mit den Hyalozyten (vgl. Abb. 3.21 c) ließen sich auch bei den RPE-Zellen in den Bereichen des besonders dichten Zellwachstums besonders deutliche Ansammlungen blau gefärbter ECM finden (vgl. Abb. 3.23 b, d).

Quantitative Aussagen über die entsprechenden prozentualen Anteile der durch die von uns durchgeführte Färbung nachgewiesenen verschiedenen GAG in den RPE-Zellkulturen lassen sich nicht treffen. Dennoch bieten die unterschiedlichen Resultate der Färbungen mit verschiedenen pH-Wert-Einstellungen eine Möglichkeit zur Unterscheidung zwischen RPE-Zellen und Hyalozyten.

Nach Hyaluronidase-Vorbehandlung war auch bei den RPE-Zellen eine im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Präparaten geringere Menge an ECM zu sehen (vgl. Abb. 3.24 a, b). Nachdem die Hyaluronidase hauptsächlich HA verdaut, kann dies ein Hinweis auf die Digestion der quantitativ im Extrazellulärraum der Zellkulturen nicht näher bestimmbar HA sein. Bei den Kontrollen nach Hyaluronidase-Vorbehandlung würde die angefärbte Matrix demnach hauptsächlich aus DS, CS und HS bestehen.

Nachdem in unseren Versuchen der Hyaluronidase-Vorverdau jedoch auch zu einer Ablösung sowohl von Zellen als auch interzellulärer Matrix führte (vgl. Abb. 3.24 a, b), ist hier von einer unspezifischen schädigenden Wirkung durch dieses Enzym auszugehen. So können diese Präparate nicht als Negativkontrolle gewertet werden.

#### 4.3.3 Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Färbungen mit Alcianblau-Farbstoffen an den Zellen des CB-Epithels zeigten im Vergleich mit den Resultaten der Färbungen an den Hyalozyten- und RPE-Zellkulturen (vgl. Abb. 3.21 a-c, Abb. 3.23 a-d) einen deutlich geringeren Nachweis Alcianblau-positiver extrazellulärer Substanzen bei den Lösungen beider pH-Werte (vgl. Abb. 3.25 a, b).

Diese Ergebnisse weisen auf das Vorhandensein geringer Mengen interzellulärer GAG hin. Durch unsere Präparationsmethode für die Zellkulturen des CB-Epithels (siehe 2.2.1.2) befanden sich in erster Linie pigmentierte und nicht pigmentierte CB-Epithel-Zellen in der PK. Jedoch konnte das eventuelle Vorliegen einer geringen Menge von Zellen des CB-Stromas nicht sicher ausgeschlossen werden. Des Weiteren kann keine definitive Aussage über den weiteren Wachstumsverlauf der einzelnen Zellen und ihren entsprechenden Anteil in den Zellkulturen der P3 gemacht werden (siehe 3.1.3 und 4.1.3).

Für die Zellen des CB-Epithels sind grundsätzlich sekretorische Funktionen bekannt<sup>81, 89</sup>, über die mögliche Produktion von GAG gibt es nur wenige Untersuchungen:

so berichten Zimmermann et al. über die Produktion von HA bei Zysten und Tumoren des CB.<sup>107</sup>

Interessante Erkenntnisse liefert die Arbeit von Rittig et al.: die Arbeitsgruppe untersuchte das anteriore Segment der Augen von Primaten nach HA produzierenden Zellen. Hierbei verwendeten sie einen polyklonalen Antikörper gegen das Enzym HA-Synthase. Sie stellten eine besonders intensive Anfärbung in der NPE-Schicht des CB-Epithels fest. Die stärksten Reaktionen ließen sich im Bereich der pars plana konstatieren. Daraus schlossen die Autoren,

dass diese Zellen, zusammen mit den Hyalozyten, für die Produktion von HA verantwortlich sind.<sup>76</sup>

Die Ergebnisse der Alcianblau-Markierungen in unseren Versuchen können das Vorhandensein extrazellulärer HA in den Zellkulturen des CB-Epithels widerspiegeln: im Vergleich zu den Resultaten der Alcianblau-Färbungen mit der Lösung des pH-Werts 1,0 ließen sich mit der auf einen pH-Wert von 2,5 eingestellten Lösung mehr extrazelluläre Strukturen nachweisen (vgl. Abb. 3.25 a, b, 3.26 b). Dies würde für das Vorliegen von hauptsächlich nicht sulfatierten extrazellulären GAG – extrazellulärer HA entsprechend – in den Zellkulturen des CB-Epithels sprechen (siehe 2.2.4.2.1).

Da jedoch bei den Lösungen beider pH-Wert-Einstellungen blau gefärbte Matrix in den Kulturen des CB-Epithels gezeigt werden konnten, kann es sich bei den detektierten GAG nicht ausschließlich um HA handeln. Nach dem derzeitigen Wissensstand gibt es keine eindeutigen Erkenntnisse über die Produktion weiterer GAG durch die Zellen des CB-Epithels.

So liefern die Arbeiten von Rittig et al.<sup>76</sup> und Zimmermann et al.<sup>107</sup>, die eine Beteiligung des CB-Epithels an der Produktion von HA vermuten, Erläuterungen für die Resultate unserer Alcianblau-Färbungen mit Zellen des CB-Epithels und machen das Vorliegen von HA, die durch die Zellen des CB-Epithels in vitro produziert wurde, wahrscheinlich.

Der Zellkulturverlauf der von uns aus dem CB-Epithel präparierten Zellen (siehe 2.2.1.2) zeigte Mischkulturen mit Vorhandensein verschiedenartiger Zellen (siehe 3.1.3).

Ohne eine spezifischere Charakterisierung der detektierten extrazellulären Matrix in den CB-Epithel-Kulturen (vgl. Abb. 3.25 a, b, Abb. 3.26 b) kann keine genauere Identifikation der markierten GAG oder der für deren Synthese verantwortlichen Zellen getroffen werden.

Trotzdem liefern unsere Ergebnisse der Alcianblau-Färbungen mit den Zellkulturen des CB-Epithels wichtige Erkenntnisse: im Vergleich mit den Resultaten der Färbungen der Hyalozyten- (vgl. Abb. 3.21 b, c) und RPE-Zellkulturen (3.23 a-d) ist bei den Zellen des CB-Epithels deutlich weniger ECM zu finden (vgl. 3.25 a, b), weshalb bei diesen Zellen von einer wesentlich geringeren Produktion von GAG ausgegangen werden kann.

Die Hyaluronidase-Vorbehandlung bewirkte auch bei den Zellkulturen des CB-Epithels eine starke Verminderung der ECM im Vergleich mit den nicht behandelten Präparaten: dies führte dazu, dass auf den Präparaten, bei denen die Lösung mit pH-Wert 1,0 verwendet worden war, keine blau angefärbte ECM zu sehen war (vgl. Abb. 3.26 a).

Auf den Präparaten, die mit der Farbstoff-Lösung mit pH-Wert 2,5 inkubiert wurden, ließen sich nur noch geringe Mengen an extrazellulärer Matrix nachweisen (vgl. Abb. 3.26 b).

Die zellschädigenden Wirkungen des Enzyms waren bei den Zellkulturen des CB-Epithels ebenfalls deutlich zu sehen (vgl. Abb. 3.26 a, b).

#### 4.3.4. Charakterisierung der Zellen anhand der extrazellulären Matrix – Zusammenfassung Alcianblau-Färbungen

Die von uns durchgeführte Markierung der ECM in den Zellkulturen mit Alcianblau-Farbstoffen stellt eine sehr einfache und schnell durchführbare Methode zur weiteren Charakterisierung der von uns untersuchten Zellen dar.

Mit Hilfe dieser Färbungen mit Lösungen unterschiedlicher pH-Wert-Einstellung war eine eindeutige Unterscheidung von Hyalozyten- (vgl. Abb. 3.21 a-c, Abb. 3.22 a, b) und RPE-Zellen (Abb. 3.23 a-d, Abb. 3.24 a, b) möglich.

Die Zellen des CB-Epithels wiesen im Vergleich zu den Hyalozyten und RPE-Zellen geringere Mengen an ECM auf (vgl. Abb. 3.25 a, b, 3.26 b). Es zeigten sich Hinweise, dass es sich bei der extrazellulären Matrix in den Zellkulturen des CB-Epithels – wie auch bei den Hyalozyten-Kulturen – im hauptsächlichen um HA handelt.

Weitere Untersuchungen mit quantitativer Bestimmung der GAG könnten zur eindeutigen Unterscheidung der Zellen des CB-Epithels von Hyalozyten und RPE-Zellen beitragen.

Auch eine spezifischere Präparation der Zellen des CB-Epithels könnte einen nächsten Schritt darstellen, genauere Erkenntnisse über die jeweilige Beteiligung der verschiedenen Zellen aus den Mischkulturen an der Produktion von GAG zu gewinnen.

Vor allem im Hinblick auf die Ergebnisse der Arbeit von Rittig et al., die neben den Hyalozyten die Zellen des NPE für die HA-Synthese verantwortlich machen,<sup>76</sup> würde der Vergleich zwischen diesen beiden Zellarten wichtige Erkenntnisse liefern.

In unseren Experimenten zeigte sich die Vorbehandlung mit dem Enzym Hyaluronidase nicht als Negativkontrolle geeignet. Die Beurteilbarkeit der Präparate war durch die zellschädigenden Wirkungen des Enzyms eingeschränkt, zudem war nur ein teilweiser Verdau der gefärbten ECM zu sehen, was auch die Unterscheidung zwischen HA und den anderen vorhandenen GAG schwierig machte (vgl. Abb. 3.22 a, b, Abb. 3.24 a, b, Abb. 3.26 b).

Die Resultate der von uns durchgeführten Immunmarkierungen in Versuchsgruppe I (siehe 3.2.2) ergaben teilweise immunhistochemische Unterschiede zwischen den porkinen und humanen Zellen.



Eine Studie von Weber et al. zeigte unter identischen Versuchsbedingungen eine im Vergleich zu humanen Zellen etwa nur halb so große Menge an synthetisierter HA und Kollagen bei porkinen Hyalozyten.<sup>104</sup>

Als nächster Schritt kann somit die Durchführung der Markierungen mit Alcianblau-Farbstoffen an Zellen von humanen Spendern weitere Erkenntnisse bringen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, Zellen aus dem GK-Raum zu charakterisieren im Hinblick auf ein Potential dieser Zellen zur Regeneration von körpereigenem GK-Gewebe. Im Fokus der Arbeit standen die Hyalozyten und die Zellen des CB-Epithels, als Kontrollgruppe dienten die Zellen des RPE.

Durch die Beobachtung der Zellkulturen in den einzelnen Passagen konnten wertvolle Erkenntnisse bezüglich des typischen Wachstumsverhaltens sowie individueller morphologischer Besonderheiten der jeweiligen Zellen gewonnen werden.

Bei allen drei untersuchten Zellarten zeigten sich Veränderungen der Zellmorphologie im Laufe der Passagen, die die wichtige Bedeutung einer Charakterisierung der Zellen unabhängig von morphologischen Kriterien deutlich machen.

Durch die immunhistochemischen Markierungen mit Antikörpern konnten die Zellen weiter definiert werden.

Durch die Immunmarkierungen der Versuchsgruppe I mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern Anti-CD-68, Anti-S-100 und Anti-S-100-A2 ließen sich typische Eigenschaften für die jeweiligen Zelltypen erkennen.

Auch konnten wir gemeinsame immunhistochemische Charakteristika von Hyalozyten und Zellen des CB-Epithels aufzeigen.

Zudem fanden wir maßgebliche Unterschiede der Reaktivität zwischen humanem und porcinem Gewebe.

Die durch Immunisierung von Versuchstieren hergestellten Antikörper Anti-H/PI und Anti-H/PII, die in Versuchsgruppe II getestet wurden, erwiesen sich als sehr sensitiv und bewirkten die Markierung von Hyalozyten sowohl in Gewebsschnitten als auch in Zellkulturen verschiedener Passagen. In Bezug auf die Spezifität erfüllten die Antikörper jedoch nur teilweise die an sie gestellten Anforderungen.

Bei den Markierungen mit Antikörpern beider Versuchsgruppen stellten die von uns festgestellten Veränderungen der Expression der Zellmarker und die Veränderung der immunhistochemischen Charakteristika im Verlauf des Wachstums der Zellen ein Problem bei der Identifizierung der unterschiedlichen Zelltypen dar.

Mit der Charakterisierung der Zellen anhand deren Expression an ECM durch die Markierung mit Alcianblau-Farbstoffen zeigten wir schließlich eine rasch und einfach durchführbare Methode, die eine Unterscheidung zwischen Hyalozyten, RPE-Zellen und Zellen des CB-Epithels möglich macht.

Auch zeigten sich Hinweise auf Gemeinsamkeiten von Hyalozyten und Zellen des CB-Epithels in Bezug auf die Produktion extrazellulärer Matrix.

Jedoch ermöglichten diese Untersuchungen keine definitiven Aussagen über die genauen Anteile der unterschiedlichen Zelltypen in den Mischkulturen des CB-Epithels.

Diese grundlegende Schwierigkeit der Identifizierung der NPE-Zellen des CB-Epithels in Kultur zeigte sich in allen von uns durchgeführten Versuchen. Aufgrund der Veränderungen der Zelleigenschaften im Verlauf des Wachstums bot der Vergleich der Ergebnisse der Immunmarkierungen der NPE-Zellschicht auf den Gewebsschnitten mit den Zellen des CB-Epithels in Kultur geringere Möglichkeiten zur Identifizierung dieser Zellen als erwartet.

Ein nächster konsequenter Schritt wäre die Entwicklung einer Methode zur noch spezifischeren Präparation der NPE-Zellen.

Die von uns in dieser Arbeit festgestellten wichtigen Gemeinsamkeiten von Hyalozyten und Zellen des CB-Epithels können so näher untersucht werden, um weitere Erkenntnisse über diese Zelltypen und ihre potentielle Bedeutung als GK-Vorläuferzellen zu gewinnen.

Dies würde einen weiteren entscheidenden Schritt auf dem Weg zum zellbasierten Glaskörper-Ersatz darstellen.

## 6. Verzeichnisse: Tabellen, Grafiken und Abbildungen

### Verzeichnis Tabellen

Tab. 2.1: Verwendete Zellkulturen Versuchsgruppe I.....	34
Tab. 2.2: Verwendete histologische Präparate Versuchsgruppe I.....	35
Tab. 2.3: Verwendete Zellkulturen Versuchsgruppe II.....	36
Tab. 2.4: Verwendete histologische Präparate Versuchsgruppe II.....	36
Tab. 2.5: Systematische Einteilung der Resultate der Immunmarkierungen mit Zellkulturen.....	37
Tab. 2.6: Verwendete Zellkulturen Alcianblau-Färbungen.....	38
Tab. 3.1: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Zellkulturen in Versuchsgruppe I.....	52
Tab. 3.2: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Paraffinpräparaten in Versuchsgruppe I.....	53
Tab. 3.3: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den humanen Zellkulturen in Versuchsgruppe I.....	53
Tab. 3.4: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den humanen Gewebsschnitten in Versuchsgruppe I.....	53
Tab. 3.5: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Zellkulturen in Versuchsgruppe II.....	67
Tab. 3.6: Ergebnisse der Immunmarkierungen an den porkinen Paraffinpräparaten in Versuchsgruppe II.....	67
Tab. 3.7: Ergebnisse der Alcianblau-Färbungen an den porkinen Zellkulturen.....	76

### Verzeichnis Grafiken

Grafik 3.1: Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Hyalozyten in den einzelnen Passagen.....	41
Grafik 3.2: Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Zellen des retinalen Pigmentepithels in den einzelnen Passagen.....	44
Grafik 3.3: Durchschnittliche Kultivierungszeiten in Tagen der porkinen Zellen des Ziliarkörper-Epithels in den einzelnen Passagen.....	47

**Verzeichnis Abbildungen**

Abb. 3.1: Wachstum der porkinen Hyalozyten .....	42
a) Porkiner Hyalozyt (PK): Einzelzelle nach Anwachsen auf dem Boden der Zellkulturflasche (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
b) Porkine Hyalozyten (P1): Formveränderung der Zellen nach Anwachsen auf dem Boden der Zellkulturflasche in die längliche Form, Ausbildung von Zellausläufern (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
c) Porkine Hyalozyten (P1): Zellen im dichten Wachstum, längliche Zellkörper, intrazytoplasmatische Granula deutlich zu erkennen (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
d) Porkine Hyalozyten (P2): konfluentes Wachstum der Zellen, 'fischzug-artig' (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
Abb. 3.2: Wachstum der humanen Hyalozyten.....	43
a) Humane Hyalozyten (P3): Zellen nach dem Anwachsen, längliche Zellkörper (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
b) Humane Hyalozyten (P3): konfluentes, 'fischzug-artiges' Wachstum (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
Abb. 3.3: Wachstum der porkinen RPE-Zellen.....	45
a) Porkine RPE-Zellen (PK): Wachstum der Zellen konzentrisch vom Gewebe ausgehend, 'pflasterstein-artig' (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
b) Porkine RPE-Zellen (PK): längliches Wachstum der Zellen im Randbereich, deutlich sichtbares Pigment (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
c) Porkine RPE-Zellen (P1): Zellen im dichten Wachstum, teils 'pflasterstein-artig', teils länglich (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
d) Porkine RPE-Zellen (P2): Zellen im dichten Wachstum, großteils längliche Zellform, kein sichtbares Pigment mehr vorhanden (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
Abb. 3.4: Wachstum der humanen RPE-Zellen.....	46
a) Humane RPE-Zellen (P3): Einzelzellen nach Anwachsen, Zellausläufer (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
b) Humane RPE-Zellen (P3): Zellen im konfluenten Wachstum (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
Abb. 3.5: Wachstum der porkinen Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	48/49
a) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): große Einzelzelle mit rund-ovalem Zellkörper, umgeben von länglichen Zellen (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
b) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): typisches Wachstumsmuster nach Adhäsion (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
c) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): dichter Zellrasen länglicher Zellen, deutlich pigmenthaltig (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 5,7)	
d) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Zellen wenige Stunden nach Präparation, große, ovale Einzelzelle, pigmenthaltig, umgeben von länglichen Zellen (Vergrößerung 10-fach, ohne Zoom)	
e) Porkine Zellen des CB-Epithels (P2): dichtes Wachstum, längliche Einzelzellen (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
f) Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): dichtes Wachstum, runder Zellkörper (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
g) Porkine Zellen des CB-Epithels (P1): dichtes Wachstum länglicher Zellen, Pigmentgehalt deutlich abnehmend (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
h) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): dichtes Wachstum länglicher Zellen, große Einzelzelle, kein intrazelluläres Pigment (Vergrößerung 20-fach, Zoom-Faktor 4,0)	
i) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): konfluentes, längliches Wachstum (Vergrößerung 10-fach, Zoom-Faktor 4,0)	

Abb. 3.6: Versuchsgruppe I: Positivkontrollen.....	51
a) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)	
b) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)	
c) Positivkontrolle: Humane Tonsille nach Inkubation mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)	
Abb. 3.7: Versuchsgruppe I und II: Negativkontrollen.....	52
a) Negativkontrolle: Porkine Hyalozyten (P3) (Vergrößerung 20-fach)	
b) Negativkontrolle: Paraffinschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper-Epithel (Vergr. 40-fach)	
Abb. 3.8: Versuchsgruppe I: Zellkulturen porkine Hyalozyten.....	54/55
a) Porkine Hyalozyten (PK): Mark. Grad II mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 40-fach)	
b) Porkine Hyalozyten (P3): Mark. Grad II mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)	
c) Porkine Hyalozyten (PK): Mark. Grad IV mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 20-fach)	
d) Porkine Hyalozyten (P3): Mark. Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 20-fach)	
e) Porkine Hyalozyten (P3): Keine Mark. mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 10-fach)	
Abb. 3.9: Versuchsgruppe I: Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten.....	55/56
a) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 20-fach)	
b) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)	
c) Porkiner GK mit Hyalozyten: Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 20-fach)	
Abb. 3.10: Versuchsgruppe I: Zellkulturen humane Hyalozyten.....	57/58
a) Humane Hyalozyten (P3): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)	
b) Humane Hyalozyten (P3): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 20-fach)	
c) Humane Hyalozyten (P3-aufgetaute Zellen): keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)	
d) Humane Hyalozyten (P3): keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 10-fach)	
e) Humane Hyalozyten (P3): keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)	
Abb. 3.11: Versuchsgruppe I: Kulturen porkine RPE-Zellen.....	59/60
a) Porkine RPE-Zellen (PK): Markierung Grad IV mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergr. 40-fach)	
b) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 40-fach)	
c) Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 10-fach)	
d) Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 40-fach)	
e) Porkine RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)	
f) Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 40-fach)	
g) Porkine RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 40-fach)	
Abb. 3.12: Versuchsgruppe I: Kulturen humane RPE-Zellen.....	61
a) Humane RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 10-fach)	
b) Humane RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 40-fach)	
c) Humane RPE-Zellen (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergr. 20-fach)	

- Abb. 3.13: Versuchsgruppe I: Kulturen porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels..... 63/64
- Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergr. 20-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, typisches Verteilungsmuster der markierten Zellen (Vergr. 10-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, typisches Verteilungsmuster der markierten Zellen (Vergr. 20-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad II mit Antikörper Anti-S-100-A2, eindeutig markierte neben nicht markierten Zellen (Vergr. 40-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad I mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Keine Markierung mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergr. 20-fach)
- Abb. 3.14: Versuchsgruppe I: Gewebsschnitte porkines Auge mit Ziliarkörper..... 64/65
- Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 20-fach)
  - Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100 (Vergrößerung 10-fach)
  - Gewebsschnitt porkines Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 20-fach)
- Abb. 3.15: Versuchsgruppe I: Gewebsschnitte humanes Auge mit Ziliarkörper..... 66
- Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: deutliche Markierung der NPE-Zellschicht des CB-Epithels im Bereich der pars plana mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)
  - Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: deutliche Markierung der NPE-Zellschicht des CB-Epithels im Bereich der pars plicata mit Antikörper Anti-S-100 (Vergr. 20-fach)
  - Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-S-100-A2 (Vergrößerung 40-fach)
  - Gewebsschnitt humanes Auge mit Ziliarkörper: keine Markierung des CB-Epithels mit Antikörper Anti-CD-68 (Vergrößerung 40-fach)
- Abb. 3.16: Versuchsgruppe II: Zellkulturen porkine Hyalozyten..... 69
- Porkine Hyalozyten (PK): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine Hyalozyten (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine Hyalozyten (PK): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine Hyalozyten (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)
- Abb. 3.17: Versuchsgruppe II: Porkiner Glaskörper mit Hyalozyten..... 70
- Porkiner GK mit Hyalozyten: Markierung Grad II mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkiner GK mit Hyalozyten: deutliche Markierung der Zellen mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 40-fach)
  - Porkiner GK mit Hyalozyten: Markierung Grad II mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
- Abb. 3.18: Versuchsgruppe II: Kulturen porkine RPE-Zellen..... 72
- Porkine RPE-Zellen (PK): Keine Markierung mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 40-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)

- Abb. 3.19: Versuchsgruppe II: Kulturen porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels..... 73/74
- Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (PK): Markierung Grad I mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung Grad V mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
- Abb. 3.20: Versuchsgruppe II: Gewebsschnitte porkines Auge mit Ziliarkörper..... 75
- Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) und der angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plicata) mit AK Anti-H/PI (Vergrößerung 20-fach)
  - Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) und der angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 40-fach)
  - Gewebsschnitt porkines Auge mit CB: Markierung der NPE-Zellschicht (Bereich pars plana) sowie eines angrenzenden Hyalozyten mit AK Anti-H/PII (Vergrößerung 20-fach)
- Abb. 3.21: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Hyalozyten.. 77
- Porkine Hyalozyten (P3): kein Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine Hyalozyten (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine Hyalozyten (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)
- Abb. 3.22: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Hyalozyten.... 78
- Porkine Hyalozyten (P3): kein Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine Hyalozyten (P3): Nachweis extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5, Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)
- Abb. 3.23: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine RPE-Zellen.. 79/80
- Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 20-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): deutliche Markierung der extrazellulären Matrix im Bereich des dichten Zellwachstums bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 20-fach)
- Abb. 3.24: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine RPE-Zellen... 81
- Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 1,0, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 10-fach)
  - Porkine RPE-Zellen (P3): Markierung der extrazellulären Matrix bei pH-Wert 2,5, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 20-fach)



Abb. 3.25: Alcianblau-Färbungen ohne Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	82
a) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 (Vergrößerung 10-fach)	
b) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5 (Vergrößerung 10-fach)	
Abb. 3.26: Alcianblau-Färbungen mit Hyaluronidase-Vorbehandlung: Porkine Zellen des Ziliarkörper-Epithels.....	83
a) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Kein Nachweis von extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 1,0 nach enzymatischer Vorbehandlung, deutliche Veränderung der Zellmorphologie (Vergrößerung 10-fach)	
b) Porkine Zellen des CB-Epithels (P3): Markierung geringer Mengen an extrazellulärer Matrix bei pH-Wert 2,5, deutliche Veränderung der Zellmorphologie durch enzymatische Vorbehandlung (Vergrößerung 20-fach)	

**7. Literaturverzeichnis**

1. Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270:517-521.
2. Al-Jazzaf AM, Netland PA, Charles S. Incidence and management of elevated intraocular pressure after silicone oil injection. *Journal of Glaucoma* 2005; 14:40-46.
3. Aronson JF. Human retinal pigment cell culture. *In Vitro* 1983; 19:642-650.
4. Asaria RH, Kon CH, Bunce C, Charteris DG, Wong D, Khaw PT, Aylward GW. Adjuvant 5-fluorouracil and heparin prevents proliferative vitreoretinopathy: results from a randomized, double-blind, controlled clinical trial. *Ophthalmology* 2001; 108:1179-1183.
5. Balazs EA. Structure of vitreous gel. *Acta XVII. Concilium Ophthalmologicum* 1954; 11:1019-1024.
6. Balazs EA. Functional anatomy of the vitreous. *Biomedical Foundations of Ophthalmology*, Vol 1, p. 6-12, Harper and Row, Philadelphia 1982.
7. Balazs EA, Denlinger JL. The vitreous. In: *The Eye*, Vol I, p. 533-589, Davson H (editor), Academic Press, New York 1984.
8. Balazs EA, Toth LZ, Eckl EA, Mitchell AP. Studies on the structure of the vitreous body. XII. Cytological and histochemical studies on the cortical tissue layer. *Exp Eye Res* 1964; 3:57-71.
9. Bartov E, Pennarola F, Savion N, Naveh H, Treister G. A quantitative in vitro model for silicon oil emulsification: Role of blood constituents. *Retina* 1992; 12:23-27.
10. BenEzra D, Chan CC. S-100 antigenic determinants in human retina. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987; 225:151-153.
11. Bertazolli Filho R, Laicine EM, Haddad A. Biochemical studies on the secretion of glycoproteins by isolated ciliary body of rabbits. *Acta Ophthalmol Scand* 1996; 74:343-347.
12. Birkeland M, Barclay AN, Brown MH, Beyers A. *The leukocyte antigen facts book*. Academic Press, London 1993.
13. Bleckmann H. Glycosaminoglycan metabolism of cultured fibroblasts from bovine vitreous. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1984; 222:90-94.
14. Bloom GD, Balazs EA. An electron microscopic study of hyalocytes. *Exp Eye Res* 1965; 4:249-255.
15. Boltz-Nitulescu G, Grabner G, Förster O. Macrophage-like properties of human hyalocytes. *Adv Exp Med Biol* 1979; 121:223-228.
16. Bridges CD. Vitamin A and the role of the pigment epithelium during bleaching and regeneration of rhodopsin in the frog eye. *Exp Eye Res* 1976; 22:435-455.

17. Campochiaro PA, Jerdon JA, Glaser BM. The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27:1615-1621.
18. Chihara E, Tsukada-Fujioka T, Tsukahara I. Synthesis of glycosaminoglycans by chick retinal pigment epithelium in vitro. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1984; 22:45-50.
19. Cicero SA, Johnson D, Reyntjens S, Frase S, Connell S, Chow LM, Baker SJ, Sorrentino BP, Dyer MA. Cells previously identified as retinal stem cells are pigmented ciliary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:6685-6690.
20. Coca-Prados M, Kondo K. Separation of bovine pigmented ciliary epithelial cells by density gradient and further characterization in culture. *Exp Eye Res* 1985; 40:731-739.
21. Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. *Cell Calcium* 1991; 12:713-726.
22. Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60:540-551.
23. Ducournau Y, Boscher C, Adelman RA, Guillaubey C, Schmidt-Morand D, Mosnier JF, Ducournau D. Proliferation of the ciliary epithelium with retinal neuronal and photoreceptor cell differentiation in human eyes with retinal detachment and proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012; 250:409-423.
24. Edwards RB. Glycosaminoglycan synthesis by cultured human retinal pigmented epithelium from normal postmortem donors and a postmortem donor with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1982; 23:435-446.
25. Elner SG, Elner VM, Nielsen JC, Torczynski E, Yu R, Franklin WA. CD68 antigen expression by human retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 1992; 55:21-28.
26. Fain GL, Cilluffo MC, Fain MJ, Lee DA. Isolation of non-pigmented epithelial cells from rabbit ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:817-821.
27. Fain GL, Smolka A, Cilluffo MC, Fain MJ, Lee DA, Brecha NC, Sachs G. Monoclonal antibodies to the H<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase of gastric mucosa selectively stain the non-pigmented cells of the rabbit ciliary body epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1988; 29:785-794.
28. Federman JL, Schubert HD. Complications associated with the use of silicon oil in 150 eyes after retina-vitreous surgery. *Ophthalmology* 1988; 95:870-876.
29. Foster WJ. Vitreous Substitutes. *Expert Rev Ophthalmol* 2008; 3:211-218.
30. François J, Verbraeken H, Victoria-Troncoso V. Transplantation of hyalocytes after pars plana vitrectomy. *Mod Probl Ophthalmol* 1979; 20:164-168.
31. François J, Victoria-Troncoso V. Transplantation of vitreous cell culture. *Ophthalm Res* 1973; 4: 270-280.
32. François J, Victoria-Troncoso V, Eekhout M. Histochemical studies of hyalocytes in tissue culture. *Ophthalm Res* 1973; 5:215-221.

33. François J, Victoria-Troncoso V, Eeckhout M. The micromorphology of hyalocytes in tissue culture. *Ophthalm Res* 1973; 5:290-299.
34. François J, Victoria-Troncoso V, Zagorski Z. Histoenzymologic study of hyalocytes in tissue culture. *Am J of Ophthalmol* 1979; 88:396-401.
35. Gabel VP, Kamplik A, Burkhardt J. Analysis of intraocularly applied silicone oils of various origins. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1987; 225:160-162.
36. Gloor BP. Radioisotopes for research into vitreous and zonule. *Adv Ophthalmol* 1978; 36:63-73.
37. Grigoryan EN, Novikova YP, Kilina OV, Philippov PP. New method of in vitro culturing of pigment retinal epithelium in the structure of the posterior eye sector of adult rat. *Bull Exp Biol Med* 2007; 144:618-625.
38. Gu P, Harwood LJ, Zhang X, Wylie M, Curry WJ, Cogliati T. Isolation of retinal progenitor and stem cells from the porcine eye. *Mol Vis* 2007; 13:1045-1057.
39. Haddad A, André CJ. Hyalocyte-like cells are more numerous in the posterior chamber than they are in the vitreous of the rabbit eye. *Exp Eye Res* 1998; 66:709-718.
40. Heidenkummer HP, Kampik A, Thierfelder S. Experimental evaluation of in vitro stability of purified polydimethylsiloxanes (silicon oil) in viscosity ranges from 1000 to 5000 centistokes. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1991; 87:226-228.
41. Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 1984; 68:708-715.
42. Hitchcock P, Ochocinska M, Sieh A, Otteson D. Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 2004; 23:183-194.
43. Iandiev I, Bringmann A, Wiedemann P. Proliferative Vitreoretinopathie: Neue Erkenntnisse in Pathophysiologie und Therapie. *Klin Monbl Augenheilkd* 2010; 227:168-174.
44. Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. Immunohistochemical localization of S-100 protein in the retina, ciliary body and iris of human fetuses. *Cell Tissue Res* 1985; 239:505-510.
45. Jacobson B. Biosynthesis of hyaluronic acid in the vitreous. V. Studies on a particulate hyalocyte glycosyl transferase. *Exp Eye Res* 1978; 27:247-258.
46. Jacobson B, Osterlin S, Balazs EA. A soluble hyaluronic acid synthesizing system from calf vitreous hyalocytes. *Proc Fed Am Soc Exp Biol* 1966; 25:588.
47. Jerdan JA, Pepose JS, Michels RG, Hayashi H, de Bustros S, Sebag M, Glaser BM. Proliferative vitreoretinopathy membranes. An immunohistochemical study. *Ophthalmology* 1989; 96:801-810.
48. Johnsen EO, Frøen RC, Albert R, Omdal BK, Sarang Z, Berta A, Nicolaisen B, Petrovski G, Moe MC. Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Exp Eye Res* 2012; 98:28-36.

49. Jonas JB, Panda-Jonas S, Singh Hayreh S. Retinal progenitor cells in the posterior pars plana of rhesus monkeys. *Br J Ophthalmol* 2004; 88:836-837.
50. Kampik A, Green WR, Michels RG, Nase PK. Ultrastructural features of progressive idiopathic epiretinal membrane removed by vitreous surgery. *Am J Ophthalmol* 1980; 90:797-809.
51. Kitada S, Shapourifar-Tehrani S, Smyth RJ, Lee DA. Characterization of human and rabbit pigmented and nonpigmented ciliary body epithelium. *Curr Eye Res* 1991; 10:409-415.
52. Koerner F, Mertz A, Gloor B, Wagner E. Postoperative retinal fibrosis – a controlled clinical study of systemic steroid therapy. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1982; 90:810-816.
53. Kohno RI, Hata Y, Kawahara S, Kita T, Arita R, Mochizuki Y, Aiello LP, Ishibashi T. Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *Br J Ophthalmol* 2009; 93:1020-1026.
54. Kohno R, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Hisatomi T, Yamaguchi M, Miyazaki M, Takeshita H, Ishibashi T, Sueishi K. Sphere formation of ocular epithelial cells in the ciliary body is a reprogramming system for neural differentiation. *Brain Res* 2006; 1093:54-70.
55. Kondo K, Coca-Prados M, Sears M. Human ciliary epithelia in monolayer culture. *Exp Eye Res* 1984; 38:423-433.
56. Layfield L. Anatomy of the human eye. 2005.  
(<http://www.images.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/ciliary-body-histology-answers.html>)  
Stand: 22.10.2010
57. Lazarus HS, Hageman GS. In situ characterization of the human hyalocytes. *Arch Ophthalmol* 1994; 112:1356-1362.
58. Lazarus HS, Schoenfeld CL, Fekrat S, Cohen S, Carol A, Hageman GS, Hackett S, Chen YS, Vinores SA, Campochiaro PA. Hyalocytes synthesize and secrete inhibitors of retinal pigment epithelial cell proliferation in vitro. *Arch Ophthalmol* 1996; 114:731-736.
59. Leaver PK, Grey RH, Garner A. Complications following silicone-oil injection. *Mod Probl Ophthalmol* 1981; 20:290-294.
60. Lincoff H, Mardirossian J, Lincoff A, Liggett P, Iwamoto T, Jakobiec F. Intravitreal longevity of three perfluorocarbon gases. *Arch Ophthalmol* 1980; 98:1610-1611.
61. MacNeil A, Pearson RA, MacLaren RE, Smith AJ, Sowden JC, Ali RR. Comparative analysis of progenitor cells isolated from the iris, pars plana, and ciliary body of the adult porcine eye. *Stem Cells* 2007; 25:2430-2438.
62. Majid MA, Hussin HM, Biswas S, Haynes RJ, Mayer EJ, Dick AD. Emulsification of Densiron-68 used in inferior retinal detachment surgery. *Eye (Lond.)* 2008; 22:152-157.
63. McMenemy PG, Djano J, Wealthall R, Griffin BJ. Characterization of the macrophages associated with the tunica vasculosa lentis of the rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:2076-2082.

64. Micklem K, Rigney E, Cordell J. A human macrophage associated antigen (CD 68) detected by six different monoclonal antibodies. *Br J Haematol* 1989; 73:6-11.
65. Moe MC, Kolberg RS, Sandberg C, Vik-Mo E, Olstorn H, Varghese M, Langmoen IA, Nicolaissen B. A comparison of epithelial and neural properties in progenitor cells derived from the adult human ciliary body and brain. *Exp Eye Res* 2009; 88:30-38.
66. Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. Identification of photoreceptor precursors in the pars plana during ocular development and after retinal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49:422-428.
67. Nishiguchi KM, Kaneko H, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. Generation of immature retinal neurons from proliferating cells in the pars plana after retinal histogenesis in mice with retinal degeneration. *Mol Vis* 2009; 15:187-199.
68. Nishitsuka K, Kashiwagi Y, Tojo N, Kanno C, Takahashi Y, Yamamoto T, Heldin P, Yamashita H. Hyaluronan production regulation from porcine hyalocyte cell line by cytokines. *Exp Eye Res* 2007; 85:539-545.
69. Noda Y, Hata Y, Hisatomi T, Nakamura Y, Hirayama K, Miura M, Nakao S, Fujisawa K, Sakamoto T, Ishibashi T. Functional properties of hyalocytes under PDGF-rich conditions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2107-2114.
70. Noulas AV, Theocharis AD, Feretis E, Papageorgakopoulou N, Karamanos NK, Theocharis DA. Pig vitreous gel: macromolecular composition with particular reference to hyaluron-binding proteoglycans. *Biochimie* 2002; 84:295-302.
71. Oberstein SY, Byun J, Herrera D, Chapin EA, Fisher SK, Lewis GP. Cell proliferation in human epiretinal membranes: characterization of cell types and correlation with disease condition and duration. *Mol Vis* 2011; 17:1794-1805.
72. Osterlin SE. The synthesis of hyaluronic acid in the vitreous. IV. Regeneration in the owl monkey. *Exp Eye Res* 1969; 8:27-34.
73. Pastor JC, de la Rúa ER, Martín F. Proliferative vitreoretinopathy: risk factors and pathobiology. *Prog Retinal Eye Res* 2002; 21:127-144.
74. Perron M, Harris WA. Retinal stem cells in vertebrates. *Bioessays* 2000; 22:685-688.
75. Raviola G, Raviola E. Intercellular junctions in the ciliary epithelium. *Invest Ophthalmol* 1978; 17:958-981.
76. Rittig M, Flügel C, Prehm P, Lütjen-Drecoll E. Hyaluronan synthase immunoreactivity in the anterior segment of the primate eye. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1993; 231:313-317.
77. Runyan TE, McCombs WB 3rd, Holton OD, McCoy CE, Morgan MP. Human ciliary body epithelium in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984; 24:687-696.
78. Saga T, Tagawa Y, Takeuchi T, Nerome K, Matsuda H. Electron microscopic study of cells in vitreous of guinea pig. *Jpn J Ophthalmol* 1984; 28:239-247.

79. Sakamoto T. Cell biology of hyalocytes. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2003; 107:866-882; discussion 883, abstract.
80. Sandner D, Engelmann K. First experiences with high-density silicone oil (Densiron) as an intraocular tamponade in complex retinal detachment. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2006; 244:609-619.
81. Sears ML. The aqueous. In: Adler's *Physiology of the Eye, Clinical Application*, Sixth Edition, p. 232-251, Moses RA (editor), C.V. Mosby, Saint Louis 1975.
82. Sebag J., *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 7-16, Springer, New York 1989.
83. Sebag J, *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 17-33, Springer, New York 1989.
84. Sebag J. *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 35-58, Springer, New York 1989.
85. Sebag J. *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 59-71, Springer, New York 1989.
86. Sebag J. *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 73-95, Springer, New York 1989.
87. Sebag J. *The vitreous – structure, function and pathology*, edition 1, p. 97-147, Springer, New York 1989.
88. Shichi H, Mahalak SM, Sakamoto S, Lin WL, Essner ES. Immunocytochemical localization of gamma-glutamyl transpeptidase in porcine ciliary epithelium. *Exp Eye Res* 1991; 53:39-46.
89. Smyth RJ, Kitada S, Lee DA. Growth of rabbit pigmented and nonpigmented ciliary body epithelium. *Vision Res* 1994; 34:137-141.
90. Sommer F, Kobuch K, Brandl F, Wild B, Framme C, Weiser B, Tessmar J, Gabel VP, Blunk T, Göpferich A. Ascorbic acid modulates proliferation and extracellular matrix accumulation of hyalocytes. *Tissue Eng* 2007; 13:1281-1289.
91. Stramm LE. Synthesis and secretion of glycosaminoglycans in cultured retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:618-627.
92. Stramm LE, Haskins ME, Aguirre GD. Retinal pigment epithelial glycosaminoglycan metabolism: intracellular versus extracellular pathways. In vitro studies in normal and diseased cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30:2118-2131.
93. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85:845-881.
94. Sun G, Asami M, Ohta H, Kosaka J, Kosaka M. Retinal stem/progenitor properties of iris pigment epithelial cells. *Dev Biol* 2006; 289:243-252.

95. Sun JK, Arroyo JG. Adjunctive therapies for proliferative vitreoretinopathy. *Int Ophthalmol Clin* 2004; 44:1-10.
96. Swann DA. Chemistry and biology of the vitreous body. *Int Rev Exp Pathol* 1980; 22:2-64.
97. Swann DA. Biochemistry of the vitreous. *Bull Soc Belge Ophthalmol* 1987; 223:59-72.
98. Theelen T, Tilanus MA, Klevering BJ. Intraocular inflammation following endotamponade with high-density silicone oil. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004; 242:617-620.
99. Uehara M, Imagawa T, Kitagawa H. Morphological studies of the hyalocytes in the chicken eye: scanning electron microscopy and inflammatory response after the intravitreal injection of carbon particles. *J Anat* 1996; 188:661-669.
100. Van Horn DL, Aaberg TM, Machemer R, Fenzl R. Glial cell proliferation in human retinal detachment with massive periretinal proliferation. *Am J Ophthalmol* 1977; 84:383-393.
101. Vidaurri-Leal J, Hohman R, Glaser BM. Effect of vitreous on morphologic characteristics of retinal pigment epithelial cells. *Arch Ophthalmol* 1984; 102:1220-1223.
102. Vinos SA, Campochiaro PA, Conway BP. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:14-28.
103. Vinos SA, Campochiaro PA, McGehee R, Orman W, Hackett SF, Hjelmeland LM. Ultrastructural and immunocytochemical changes in retinal pigment epithelium, retinal glia, and fibroblasts in vitreous culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:2529-2545.
104. Weber H, Landwehr G, Kilp H, Neubauer H. Mechanical properties of the vitreous in pig and human donor eyes. *Ophthalm Res* 1982; 14:335-343.
105. Yamashita H, Sears M. Proof that the ciliary epithelium can regenerate. *Exp Eye Res* 1978; 27:199-213.
106. Zhu ZR, Goodnight R, Sorgente N, Blanks JC, Ogden TE, Ryan SJ. Cellular proliferation induced by subretinal injection of vitreous in the rabbit. *Arch Ophthalmol* 1988; 106:406-411.
107. Zimmerman LE, Fine BS. Production of hyaluronic acid by cysts and tumors of the ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1964; 72:365-379.
108. Zinn K, Benjamin-Henkind J. Anatomy of the human retinal pigment epithelium. In: *The Retinal Pigment Epithelium*, p. 9-13, Zinn K, Marmor M (editors), Harvard University Press, Cambridge 1979.



**8. Danksagung**

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. C. P. Lohmann für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung wertvoller Informationen.

Meinen besonderen Dank möchte ich Frau Dr. K. Kobuch aussprechen für ihre exzellente wissenschaftliche Betreuung. Durch ihr großes Engagement und ihr Interesse hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihr großartiger Einsatz und ihre Ausdauer sollen an dieser Stelle besonders hervorgehoben werden.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Frau P. Eberl für die Unterstützung und hervorragende Kooperation bedanken. Sie zeigte sich immer sehr hilfsbereit beim Erlernen von Präparations-Methoden und histologischen Techniken.

Diese Arbeit entstand im Rahmen des Projekts 'Zellbasierter Glaskörper-Ersatz', gefördert von der Bayerischen Forschungstiftung, AZ 616/04.