

Aus dem Hornhaut und Transplantationslabor  
der Augenklinik des  
Universitätskrankenhaus Eppendorf  
Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. Gisbert Richard

**Zur Phagozytose  
durch Retinale Pigmentepithelzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg vorgelegt

von  
Mike O. Karl

aus Kassel

Hamburg 2005

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **18.04.2006**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: **Prof. Dr. K. Engelmann**

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: **PD Dr. U. Schaudig**

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: **PD Dr. O. Strauss**

*Meinen Eltern gewidmet*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Retinales Pigmentepithel (RPE).....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Anatomischer Aufbau der Retina.....	1
1.1.2. RPE Struktur & Funktion.....	2
<b>1.2. RPE Phagozytose &amp; Tissue Engineering .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Einführung.....	4
1.2.2. Zellkulturmedienbedingungen.....	5
<b>1.3. Physiologie der RPE - Phagozytose .....</b>	<b>7</b>
1.3.1. Einführung.....	7
1.3.2. Phagozytoserezeptoren.....	8
1.3.3. Systeme sekundärer Botenstoffe.....	10
<b>1.4. Pathophysiologie – RPE Phagozytosedefekt.....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Einführung.....	12
1.4.2. Pathomechanismen eines Phagozytosedefektes.....	13
<b>2. Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>16</b>
<b>3.1. Material.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2. Zellkulturmedien und -supplemente.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Lösungen .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4. Zellkultur .....</b>	<b>19</b>
3.4.1. Humane primäre RPE Zellen.....	19
3.4.2. Humane permanente RPE Zellen.....	22
3.4.3. RPE Zellen der RCS- und Kontroll Ratte.....	23
<b>3.5. Immunhistochemische Färbungen.....</b>	<b>24</b>
3.5.1. Gewebeschnitte .....	24
3.5.2. Zellkulturen .....	25
<b>3.6. Prozessierung von Photorezeptoraußensegmenten.....</b>	<b>25</b>
3.6.1. Isolierung von Photorezeptoraußensegmenten (OS).....	25
3.6.2. Qualitätskontrolle der OS.....	27
<b>3.7. Messung der Phagozytose .....</b>	<b>28</b>
3.7.1. Einführung.....	28
3.7.2. Fluoreszenzmarkierung der OS.....	29
3.7.3. Inkubation der Zellen mit OS .....	30
3.7.4. Zytofluorometer Technik .....	30
3.7.5. Durchflusszytometer Technik .....	32
3.7.6. Datenauswertung und -darstellung.....	36

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.</b>	<b>Methode der Phagozytosemessung .....</b>	<b>37</b>
4.1.1.	Zytofluorometrietchnik .....	37
4.1.2.	OS Konkurrenztest .....	38
<b>4.2.</b>	<b>Charakterisierung der SV40-RPE Phagozytose.....</b>	<b>38</b>
4.2.1.	Einfluss der OS Menge .....	38
4.2.2.	Phagozytosekinetik .....	39
4.2.3.	Serumeinfluss .....	40
<b>4.3.</b>	<b>Phagozytose und Tissue Engineering.....</b>	<b>41</b>
4.3.1.	Serumfreie Medien .....	41
4.3.2.	Serumsupplementierte Medien .....	41
4.3.3.	Chorioidea konditioniertes Medium .....	42
4.3.4.	Retinaextrakt.....	43
4.3.5.	Komplettmedien .....	44
<b>4.4.</b>	<b>Physiologie der RPE Phagozytose .....</b>	<b>45</b>
4.4.1.	Beteiligung von MerTK /Gas6.....	45
4.4.2.	Beteiligung des L-Typ $Ca^{2+}$ - Kanal .....	50
4.4.3.	Beteiligung von Proteintyrosinkinasen.....	53
4.4.4.	Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF .....	56
4.4.5.	Versuche an primären Kontrollratten-RPE .....	58
<b>4.5.</b>	<b>Pathophysiologie der RPE Phagozytose .....</b>	<b>59</b>
4.5.1.	Phagozytosedefizit durch MerTK Mutation .....	59
4.5.2.	Beteiligung des L-Typ $Ca^{2+}$ - Kanal .....	59
4.5.3.	Beteiligung von Proteintyrosinkinasen.....	61
4.5.4.	Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF .....	63
4.5.5.	Zusammenfassung: Gegenüberstellung Kontroll-RPE und RCS-RPE .....	65
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>5.1.</b>	<b>Methode der Phagozytosemessung .....</b>	<b>66</b>
5.1.1.	Zytofluorometrietchnik .....	66
5.1.2.	OS Konkurrenztest .....	68
<b>5.2.</b>	<b>Charakterisierung der Phagozytose durch SV40-RPE.....</b>	<b>68</b>
5.2.1.	Einfluss der OS – Menge .....	68
5.2.2.	Kinetik der OS Phagozytose.....	69
5.2.3.	Einfluss von fetalen Kälberserum .....	69
<b>5.3.</b>	<b>Phagozytose und Tissue Engineering.....</b>	<b>70</b>
5.3.1.	Serumfreie Medien .....	70
5.3.2.	Serumsupplementierte Medien.....	72
5.3.3.	Chorioidea konditioniertes Medium .....	72
5.3.4.	Retinaextrakt.....	74
5.3.5.	Komplettmedien .....	75
<b>5.4.</b>	<b>Physiologie der RPE Phagozytose .....</b>	<b>76</b>
5.4.1.	Beteiligung von MerTK /Gas6.....	76
5.4.2.	Beteiligung von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen .....	80
5.4.3.	Beteiligung von Proteintyrosinkinasen.....	85
5.4.4.	Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF .....	86

<b>5.5. Pathophysiologie der RPE Phagozytose .....</b>	<b>90</b>
5.5.1. Phagozytosedefizit durch MerTK Mutation .....	91
5.5.2. Beteiligung von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen .....	91
5.5.3. Beteiligung von Proteintyrosinkinase.....	92
5.5.4. Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF .....	93
5.5.5. Zusammenfassung: Kontroll-RPE versus RCS-RPE Phagozytose .....	95
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>98</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>113</b>
8.1. Formulierungen der Zellkulturmedien.....	113
8.2. Überblick der OS Isolationen .....	114
8.3. Zusammenfassung: Kontroll-RPE und RCS-RPE.....	115
8.4. Veröffentlichungen von Teilen der Arbeit .....	116
8.5. Erklärung .....	116
8.6. Abkürzungen .....	117
8.7. Danksagung.....	118
8.8. Lebenslauf .....	119



# 1. Einleitung

## 1.1. Retinales Pigmentepithel (RPE)

### 1.1.1. Anatomischer Aufbau der Retina

Die Retina besteht aus zwei Schichten. Das äußere Blatt bildet die Pigmentepithelschicht (Stratum pigmentosum). Es erstreckt sich vom Sehnerveneintritt bis zum Pupillarrand. In der Reihenfolge der oben genannten Abschnitte unterteilt man es in retinales Pigmentepithel (RPE), Ziliares Pigmentepithel (PCM) und Irispigmentepithel (IPE). Das innere Blatt, die neurosensorische Retina enthält im Bereich der Pars optica die Photorezeptoren und zwei Schichten von Nervenzellen, Stratum nervosum. Die neurosensorische Retina und das RPE haben einen gemeinsamen, ektodermalen Ursprung (Vinores et al., 1995). Die Zellen der Photorezeptorschicht, Stratum neuroepitheliale, liegen als Stäbchenzelle und Zapfenzelle vor. Peripher befinden sich die Stäbchenzellen im Vergleich zu den im zentralen Teil (Fovea centralis) angereicherten Zapfenzellen.

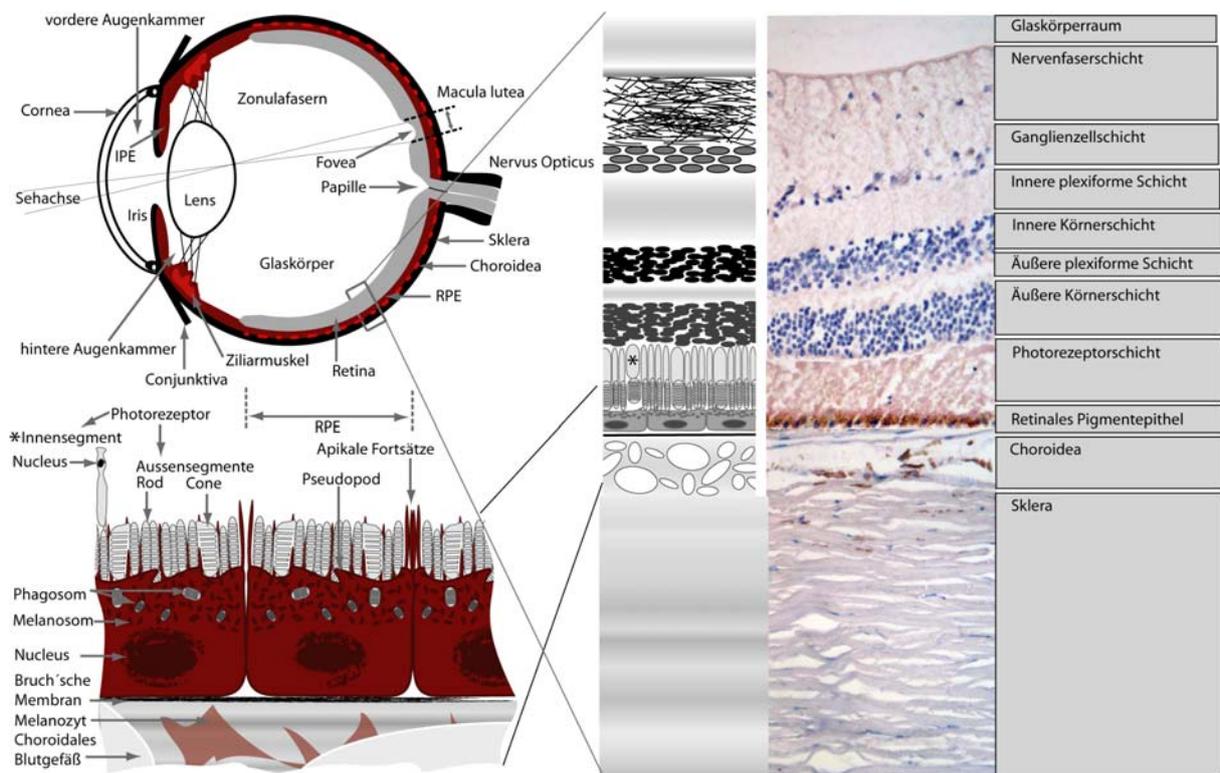


Abb.1.1: Zur Anatomie des Auges: (oben links) Horizontalschnitt durch das menschliche Auge, (rechts) vergrößerter Ausschnitt durch die Schichten der Netzhaut mit Choroidea und Sklera und (unten links) Schemazeichnung der Interaktion von retinalem Pigmentepithel (RPE) mit den OS der Netzhaut. Die Retina des menschlichen Auges ist ein 0,1 bis 0,5 mm dünnes, lichtdurchlässiges Gewebe, mit dem im histologischen Schnitt (Abb. 1.1) dargestellten Schichtenaufbau. Man unterscheidet drei flächenhafte Abschnitte: die Pars optica retinae, am Augenhintergrund der Aderhaut (Choroidea) anliegend, der Pars ciliaris retinae an der Innenfläche des Corpus ciliare (Pars plana) und der Pars iridica retinae an der Hinterfläche der Iris. Die Pars optica ist lichtempfindlich, die beiden folgenden blind, Pars caeca. Die Grenze zwischen beiden nennt man Ora serrata.

Die Gliederung der Photorezeptorzelle: ein Außensegment, ein Innensegment, einen kerntragenden Abschnitt und einem Endkolben (Abb. 1.1). Die schätzungsweise 120 Mio. Stäbchenzellen (humane Retina) sind zylinder- oder stäbchenförmig (90 µm lang, 1 bis 5 µm breit). Ihr Außensegment besteht hauptsächlich aus 600 bis 1000 flachen von einer Membran umgebenen übereinander liegenden Scheibchen (abgeflachte Bläschen), so genannte Disks. Die Verbindung zwischen Innen- und Außensegment erfolgt über eine schmale exzentrisch gelegene zytoplasmatische Brücke.

Die Außensegmente der etwa 6 Mio. Zapfenzellen (60 µm lang, 3 µm breit) hingegen sind nach apikal hin verschmälert und haben somit eine konische Form. Weiterhin enthält es nur scheinbar gestapelte, abgeflachte Bläschen; in Wirklichkeit handelt es sich um Invaginationen der Zellmembran. Die Photorezeptoren stehen in direktem Kontakt mit dem retinalen Pigmentepithel (RPE), einem einschichtigen, isoprismatischen Epithel. Die Anzahl der Photorezeptoren in Kontakt mit einer RPE Zelle liegt beim Menschen etwa bei 23 in der Fovea (Gao, et al. 1992). Das RPE bildet die Blut-Retina Barriere zwischen subretinalen Spalt und der gefäßreichen Aderhaut, der Choroidea. Die apikale Seite des RPE ist den Photorezeptoren zugewandt und die basolaterale Seite liegt auf der Bruch'schen Membran.

### 1.1.2. RPE Struktur & Funktion

In einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel wurden die Hauptfunktionen des RPE wie folgt summiert: Epithelialer Transport, Gliafunktion, Lichtabsorption, Phagozytose, Sehzyklus und Sekretion (Strauss 2005) (siehe Abb. 1.2).

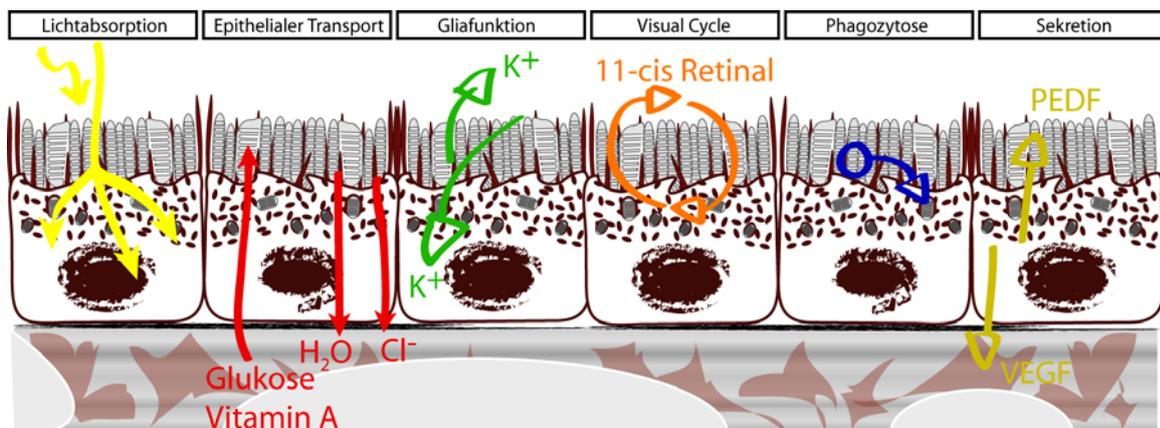


Abb. 1.2: Zusammenfassung elementarer Funktionen des retinalen Pigmentepithel (verändert nach (Strauss 2005); VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; PEDF = pigmentepithelialer Wachstumsfaktor)

Als Erstbeschreiber gilt Jones, der bereits 1833 einen Monolayer aus hexagonalen Zellen entdeckte. 1938 gelang es dann erstmals Wolff das RPE mit Hilfe der indirekten Ophthalmoskopie *in vivo* zu sehen. Seitdem haben zahlreiche wissenschaftliche Arbeitsgruppen die Morphologie des RPE untersucht und wie folgt beschrieben (Marmor, et al. 1998, Zinn, et al. 1979). Das RPE besteht aus einer einfachen Schicht hexagonaler, kubisch-prismatischer, sekretorischer Epithelzellen, die charakterisiert sind durch einen hohen Gehalt an Melaninpigment in zytoplasmatischen Granula, genannt Melanosomen. Neben dem Melaninpigment findet sich noch ein anderes Pigment, das autofluoreszente Lipofuszin. Dieses akkumuliert im Alter. Es ist ein Alterspigment des Nervensystems.

*In vivo* bildet das RPE das Transportorgan zwischen dem vaskulären System der Choroidea und dem subretinalen Raum und dient so auch als chemische Barriere zum Schutze der neurosensorischen

Retina. Dabei weist das differenzierte RPE morphologische und funktionelle Polarität auf. Basal wird das RPE durch die pentalamelläre Bruch'sche Lamina, mit der sie durch Hemidesmosome verbunden ist (Miki, Bellhorn, und Henkind, 1975), von der sie mit Blut versorgenden Choroidea abgegrenzt. An ihrer apikalen Oberfläche steht es mit den Photorezeptoraußensegmenten in Verbindung. Dazwischen ist der subretinale Spalt erfüllt mit der Interphotorezeptormatrix.

Größe, Form und Melaniningehalt des RPE variieren abhängig von seiner Lage innerhalb des Auges und vom Alter. Die Größe einer RPE Zelle am hinteren Augenpol beim jugendlichen Erwachsenen beträgt etwa  $14 \times 14 \mu\text{m}$  (Tso und Friedmann, 1967), während sie im Bereich der Ora serrata verbreitert ( $60 \mu\text{m}$ ) und abgeflacht erscheinen (Hogan, 1971). Mit zunehmendem Alter werden die Zellen größer und der Melaniningehalt in der Makulazone, der dort von Anfang an höher ist als in der Peripherie, nimmt zu (Usher, 1906). Die im RPE enthaltenen Melanosomen dienen zum Schutz der Photorezeptoren durch Absorption von Lichtenergie und durch Reduktion von Lichtstreuung (Peters, et al. 2000, Peters, et al. 2001, Schraermeyer, et al. 1999a, Schraermeyer, et al. 1999c). Ferner wird die Funktion der Melanosomen als spezifisches Kalziumspeicherorgan diskutiert (Salceda 1989, 1992, Salceda, et al. 2000). Desweiteren wurde auch eine Interaktion mit dem lysosomalen System (Schraermeyer, et al. 1999c) beschrieben. Der Kalziumgehalt des RPE wurde als außergewöhnlich hoch ermittelt (Bellhorn, et al. 1976, Hess 1975, Panessa, et al. 1981, Zadunaisky, et al. 1972) und scheint vom Melanosomengehalt abzuhängen (Lavallee, et al. 2003).

Während das RPE bis zum 2. Lebensjahr eine Fläche von  $8 \text{ mm}^2$  einnimmt, steigt seine Fläche durch Wachstumsprozesse bis zum 45. Lebensjahr auf  $11 \text{ mm}^2$ . Die Zellzahl beträgt gleich bleibend circa  $400'000$  (Vinores et al., 1995), da sie in vivo mitotisch inaktiv sind (Campochiaro et al., 1991).

Kühne (1879) stellte als erster fest, dass apikale Zellfortsätze des RPE die Photorezeptoraußensegmente umgeben. Ihre Länge steht in Abhängigkeit zur Belichtung. Zwischen diesen Fortsätzen befinden sich Mikrovilli. Das apikale Zytoplasma enthält Mikrofilamente, Mikrotubuli und den größten Anteil der Melanosomen. Im Mittelteil folgen Nukleus, die Organe für die Synthese (Golgiapparat, Endoplasmatisches Retikulum, etc.) sowie die Organe der intrazellulären Verdauung, den Lysosomen.

Die basale Plasmamembran zeigt basale Einfältelungen zur Oberflächenvergrößerung für Absorption und Sekretion. Die basal befindliche Bruch'sche Membran besteht aus fünf Schichten. Die durch das RPE selbst gebildete Basallamina ( $0,3 \mu\text{m}$ ) liegt nicht in den basalen Einfältelungen der basalen Plasmamembran. Die Fibrillen der Basallamina jedoch erstrecken sich zwischen den RPE Zellen der nächsttieferliegende inneren Kollagenschicht. Sie kommuniziert über die mittlere elastische Schicht mit der äußeren Kollagenschicht. Ihr folgt die Basallamina des Endothels der Choroidea. Lateral sind die RPE Zellen alle über nahe apikal liegende Zonula occludentes miteinander verbunden.

Ein transzellulärer Flüssigkeitstransport besteht hauptsächlich aus dem subretinalen Raum in Richtung Choroidea und vermutlich geringfügiger umgekehrt. Durch diesen Flüssigkeitstransport, aber auch durch Synthetisierung der Interphotorezeptormatrix, bestehend aus sauren Mucopolysacchariden, Proteinen und anderen großen Molekülen und den Kontakt der Mikrovilli mit den OS kommt es auch zur Aufrechterhaltung der Adhäsion der neurosensorische Retina am RPE. Der Flüssigkeits-, Aminosäuretransport aus Richtung der Retina zur Choroidea und der gegenläufige Vitamin A Transport zeigt die funktionelle Polarität.

Das RPE ist weiterhin ein Speicher für Vitamin A. Das durch Licht isomerisierte Rhodopsin der OS wird vom OS zum RPE transportiert und dort enzymatisch regeneriert. Beim Sehvorgang und damit der Reaktion auf Lichtreize kommt es im subretinalen Raum zur Veränderung der Ionenzusammensetzung. Das RPE ist zusammen mit den Müllerzellen, den Glia- und Stützzellen der Retina, beteiligt an der Stabilisierung der Ionenhomöostase. Vor allem letztere regulieren vermutlich intraretinale Änderungen und das RPE kompensiert den subretinalen Raum. Dabei spielt der Wassertransport in Richtung Choroidea eine wichtige Rolle. Kalium und Kalzium sind die beiden Hauptionen, welche im subretinalen Raum größeren Schwankungen unterliegen.

Eine weitere RPE Eigenschaft ist die Sekretion von Transmitterstoffen mit autokrinen und parakrinen Wirkungen. Sezerniert werden Wachstumsfaktoren und Signaltransmitter die am Erhalt struktureller Integrität, der Ausbildung eines immunprivilegierten subretinalen Raums und der funktionellen Regulation physiologischer und pathophysiologischer Prozesse teilnehmen.

Eine andere RPE-OS Interaktion bildet der Vorgang zur Erneuerung der OS. Die OS sind permanent Strahlungsenergie (Licht) und Sauerstoff (von der Choroidea) und damit der Bildung freier Radikale ausgesetzt, welche die Membran beschädigen. Somit werden täglich bis zu 100 Membranscheiben am distalen Ende der OS vom RPE phagozytiert, während neue Membranscheiben synthetisiert werden. Dieser Vorgang ist entscheidend für das Überleben der Photorezeptorzellen (Young and Bok, 1969; Bok and Hall, 1971; Beshare 1982; 1988) und wird ausführlich in Kapitel 2.3 erläutert.

## **1.2. RPE Phagozytose & Tissue Engineering**

### **1.2.1. Einführung**

Die ersten Experimente mit RPE Zellkulturen wurden vor mehr als 80 Jahren durchgeführt (Zinn, et al. 1979). Für diese Studien wurden entweder RPE Zellen verschiedener Spezies frisch entnommen oder dann aus selbigen Zelllinien hergestellt (Dunn, et al. 1996, Nabi, et al. 1993). Das Studium frisch isolierter RPE Zellen ist hoch interessant, da immer mehr Tiermodelle mit verschiedenen genetischen Konstitutionen neue Einsichten ermöglichen (Schlichtenbrede, et al. 2002).

Ein anderes Interesse an RPE Zellkulturen stellt die Gewebeersatztherapie dar. Bei Patienten mit RPE bedingten Erkrankungen könnte die Transplantation gesunder RPE Zellen in Zukunft möglicherweise die Progression verringern oder verhindern und möglicherweise auch zu Heilungen führen (Aramant, et al. 2002, 2004, Gouras, et al. 1989, Gouras, et al. 1991, Lund, et al. 2001a, Lund, et al. 2001b, Sheedlo, et al. 1989, 1991, Tamai 1996, Yamaguchi 1993). Es gibt verschiedenste Ansätze für die Transplantatherstellung, doch in den meisten Fällen ist die eine Phase der Zellkultivierung vor Transplantation notwendig (Boulton, et al. 2004). Dies ist einerseits durch die geringe Verfügbarkeit von Transplantaten aus RPE Spenderzellen verstorbener junger Patienten begründet (Boulton, et al. 2004), die passend für den jeweiligen Patienten mit einem möglichst geringen Risiko der Transplantatabstoßungsreaktion sind (Algere, et al. 1999, Jiang, et al. 1994, Radtke, et al. 2002, Valtink, et al. 1999a, Ventura, et al. 1996, Ye, et al. 1995, Zhang, et al. 1998). Andererseits bedarf auch die Herstellung eventuell zukünftiger Transplantatalternativen zum RPE Ersatz aus autologem Iripigmentepithel (Lappas, et al. 2004, Thumann, et al. 2004), retinalen Progenitor oder sonstigen adulten und embryonalen Stammzellen (Haruta, et al. 2004, Haruta 2005, Kociok 2004, Seiler, et al. 2005), eine Zellkulturphase zur Prä- oder Volldifferenzierung vor Transplantation. Unter den bisher für die Kultivierung von RPE Zellen verwendeten Bedingungen kann es zu Veränderungen von morphologischen und

funktionellen Charakteristika kommen (Alge, et al. 2003, Burke, et al. 1996, Gelfman, et al. 1998, Pfeffer 1990, Song, et al. 1990, Strauss, et al. 1994a, Valtink, et al. 1999b, West, et al. 2001, Zhao, et al. 1997). Die Herstellung von qualitativ hochwertigen RPE Zelltransplantaten, die sich vollständig strukturell und funktionell integrieren und somit zu einem Behandlungserfolg führen, ist noch nicht erreicht. Schlussendlich besteht sowohl für die Herstellung von RPE Zellkulturen für die Grundlagenforschung als auch von RPE Transplantaten für Patienten noch ein zu geringfügiges Wissen, sowie entsprechende Techniken für Kontrolle und Erhalt zelleigener Funktionen und Morphologie in vitro (Boulton, et al. 2004). Die Diversität an Zellkulturtechniken in der Literatur ist sehr vielfältig. Die dadurch entstehenden Differenzen sind nicht bekannt und dieses Wissen ist notwendig für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen und die Herstellung standardisierter qualitativ hochwertiger RPE Zellkulturen und Transplantate. Um diese Qualität zu verstehen und zu verifizieren bedarf es standardisierten Testungen. Die Prüfung der Phagozytoseleistung in vitro ist eine bedeutende Funktionsprüfung des RPE.

### 1.2.2. Zellkulturmedienbedingungen

ZELLKULTURMEDIENBEDINGUNGEN - das Verständnis und im besten Falle die Kontrolle darüber, spielen eine bedeutende Rolle im „Tissue Engineering“ und finden auch zunehmend mehr Beachtung in der Grundlagenforschung. Es gibt viele Studien zum Einfluss von Zellkulturbedingungen auf morphologische Eigenschaften (Hu, et al. 2001) oder Proteinexpression (Tian, et al. 2004, Uetama, et al. 2003, West, et al. 2001) der RPE Zellen, aber nur wenige im Zusammenhang mit zellulären Funktionen (Valtink, et al. 1999b, von Recum, et al. 1999). Diese „in vitro Differenzierung“<sup>1</sup> ist in vielerlei Hinsicht von Interesse. Das Gesamtziel liegt in der Entwicklung definierter Zellkulturbedingungen, welche die Expansion und /oder die „in vitro Differenzierung“, kontrolliert ermöglichen. Eine Grundannahme ist, dass diese Bedingungen der in vivo Umgebung der Zellen bestmöglich entsprechen sollen.

ZELLKULTURBASALMEDIEN basieren auf unterschiedlichen Rezepten physiologischer Salzlösungen mit Supplementen, wie Zucker, Aminosäuren, zusätzliche Ionenpuffer, Vitaminen, pH Indikatoren, Antioxidanzien, Lipiden und anderen Energieträgern (Dulbecco, et al. 1959, Ham, et al. 1979). Seit der Entwicklung der heute meist gängigen Zellkulturbasalmidien ist das Wissen für die adäquate Auswahl in Bezug auf die jeweilige Anwendung nicht weit fortgeschritten.

Ist die Expansion von Zellen notwendig, kommt klassischerweise die Zugabe von Serum ins Spiel. Serum ist ein komplexes Supplement von weitgehend nicht bekannter Zusammensetzung und wird zumeist immer noch in unphysiologischen Konzentrationen eingesetzt, um Zellproliferation zu stimulieren. Folglich entsteht spätestens hier der Kontrollverlust über die in vitro Differenzierung der Zellen (Vinores, et al. 1995, West, et al. 2001). Zum Beispiel wird die Ausbildung von Zell-Zellkontakten, den Tight-junctions, durch Serum inhibiert (Chang, et al. 1997). Oder Serum stört bei der Stimulation und Detektion von RPE sezernierten Stoffen (Peng, et al. 2003).

SERUMFREIE ZELLKULTIVIERUNG ist ein elementares Ziel der Transplantatentwicklung (Bednarz, et al. 2001, Hempel, et al. 2001, Moller-Pedersen, et al. 2001), spielt aber auch zunehmend eine wichtige Rolle bei jeglichen zellbiologischen und –physiologischen Untersuchungen. Denn nur die Gewebs-

---

<sup>1</sup> Die Differenzierung bezeichnet in der Biologie das Verschiedenwerden von Zellen oder biologischen Strukturen während der Individualentwicklung (Ontogenese). Die „in vitro Differenzierung“ ist ein umstrittener Terminus, der vor allem im Tissue Engineering zum Tragen kommt. Er beschreibt den Erhalt, und /oder die Wiederherstellung, sowie bei Stammzellen auch die Neuausbildung, zellspezifischen Merkmale (Struktur, Funktion, Polarität, Proteinexpression, etc.) in vitro.

zucht in definierten Bedingungen ermöglicht die Kontrolle und damit Steuerung zelleigener Charakteristika in Kultur. Die serumfreie RPE Kultivierung, den Erhalt vitaler Zellen und deren Expansion in vitro, ist möglich (Oka, et al. 1984, Tezel, et al. 1998). Es kommen definierte Zellkulturmedien (alle Inhaltsstoffe bekannt) zum Einsatz, die neben den Inhaltsstoffen der Basalmedien auch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Hormone, Makroproteine und weiteres enthalten. Doch in Bezug auf die beiden veröffentlichten Medienformulierungen ist nicht bekannt, wie der Einfluss auf den funktionellen Status der RPE Zellen ist. Für die RPE Zellen in vitro fehlen adäquate Formulierungen der Zellkulturmedien, die für die jeweilige Zellkulturphase (Expansion, Kryokonservierung und Transplantatvorbereitung) oder Anwendung (Proliferation oder in Ruhe, hoher Transepithelialer Widerstand, etc.) formuliert sind.

FUNKTIONSPRÜFUNGEN an RPE Zellen in vitro sind der notwendige Schritt, um die jeweiligen Zusammenhänge mit den Zellkulturbedingungen zu verstehen. Die Notwendigkeit der Phagozytosefunktionsprüfung ergibt sich aus der Tatsache, dass die Phagozytose sich in Abhängigkeit der Morphologie (Feng, et al. 2003, McLaren 1996) und der Wachstumsoberfläche verändert (Miceli, et al. 1996). Die Phagozytoseleistung von RPE Zellen erwies sich auf ihrer natürlichen Matrix, der Bruchmembran, nicht effektiver als auf den getesteten artifiziellen Matrices. RPE Zellen in vitro werden in Abhängigkeit der Passage in ihrer Phagozytosefähigkeit beeinträchtigt (Hall, et al. 1997).

Bis dato war für die Phagozytostestung der Serumzusatz essentiell, da dieser spezifische Liganden enthält. Selbst wenn die schon identifizierten Liganden supplementiert werden würden, wären vergleichende Experimente unter Serumzugabe notwendig, um die spezifische stimulierte Phagozytose durch RPE Zellen besser untersuchen zu können.

DEFINIERTER MEDIEN, die die bisher verwendeten Vollmedien mit teils komplexen Zusätzen wie Serum vollständig ersetzen sollen, erfordern die Identifikation der notwendigen Faktoren sowie deren Summenwirkung. Ein für fetales humanes RPE entwickeltes Vollmedium ist hinsichtlich der Charakterisierung zell-differenzierter Eigenschaften am weitesten vorangeschritten (Hu, et al. 2001, Pfeffer 1990). Doch die Übertragbarkeit auf adultes RPE ist noch nicht getestet worden.

In vorhergehenden Studien ist der positive Einfluss eines anderen Zellkulturvollmedium, F99<sub>RPE</sub>, auf den Erhalt zellcharakteristischer Kalziumionenkanäle vor und nach Kryokonservierung adulter humaner RPE Zellen beobachtet worden (Valtink, et al. 1999b). F99<sub>RPE</sub> wurde speziell für die Zellexpansion adulter humaner RPE Zellen optimiert (Engelmann, et al. 2004, Sobottka Ventura, et al. 1996). Weiterhin konnte mit dem kommerziell erhältlichen definierten serumfreien hSFM Medium erfolgreich die Isolation und Expansion adulter humaner RPE Zellen durchgeführt werden. Es war möglich morphologische Charakteristika, die in gängigen serumsupplementierten Zellkulturen verloren gehen, zu erhalten. Dazu gehörten Pigmentierung, Mikrovilli und Proteinexpression von ZO1 (Doubilei, et al. 2002).

KOMPLEXE SUPPLEMENTE sind hier hoch konzentrierte Zusätze mit undefinierten Inhaltsstoffen. Das klassische Beispiel ist fetales oder adultes Serum verschiedener Spezien. Darin sind alle natürlichen Bestandteile des Blutes enthalten - lediglich die Blutkörperchen und die Gerinnungsfaktoren wurden entfernt. Somit ist Serum ähnlich in vivo auch in der Zellkultur Träger von Nährstoffen, Antioxidanzien, Transportorganen, Puffer, Immunabwehr, vielen Signaltransmitterstoffen, Substraten und Katalysatoren. Dabei schwankt unkontrolliert je nach Abfüllcharge die Zusammensetzung.

Weiterhin gehören zu den komplexen Supplementen gewebe- und zellkonditionierte Medien sowie Gewebe- und Zellextrakte. Im Falle des RPE sind die Nachbarstrukturen von Interesse für die Herstel-

lung solcher Zusätze. Eine Grundannahme ist, dass die in vivo Umgebung der Zellen mit an der strukturellen und funktionellen Homöostase beteiligt ist (Weaver, et al. 2004) und dieses Milieu durch Selbstkonditionierung als auch parakrin durch Nachbarzellen zustande kommt. Die Choroidea nach Entfernung des RPE wurde schon zuvor für die Herstellung von konditioniertem Medium (ChCM) genutzt (Coulombe, et al. 1991, Coulombe, et al. 1993, Engelmann, et al. 2004, Valtink, et al. 1999b, Ventura, et al. 1996). Die Retina wurde als Extrakt (RE) (Hu, et al. 2001, Pfeffer 1990) oder konditioniertes Medium (Peng, et al. 2003) ebenfalls schon erfolgreich bei der RPE Zellkultivierung genutzt. Zusammengefasst erwiesen sich sowohl ChCM als auch RE nützlich zu Proliferationsförderung sowie der Erhaltung definierter RPE zellspezifischer Eigenschaften in vitro.

### **1.3. Physiologie der RPE - Phagozytose**

#### **1.3.1. Einführung**

In Abhängigkeit des Zelltypus (Makrophage, Neutrophile, Gliazellen, etc.) und auch des zu phagozytierenden Partikels (seneszente Erythrozyten, Tumorzellen, Mikroorganismen, etc.) unterscheidet man verschiedene zum Teil sehr spezifische, rezeptorvermittelte Prozesse. Makrophagen sind professionelle Phagozyten und zum Teil gewebsspezifisch spezialisiert. Ein klassisches Beispiel ist die Fc-Rezeptor vermittelte Phagozytose der Makrophagen. Wie bereits unter 2.1.2 erwähnt sind auch retinale Pigmentepithelzellen (RPE) zur Phagozytose befähigt.

Die Lichtreaktion und die Exposition der Photorezeptoren mit hoher Lichtenergie führt zur Akkumulation defekter Proteine, Lipide und toxischer Substanzen im Photorezeptoraußensegment (engl. outer segment; OS). Um die Funktion der OS weiter zu gewährleisten unterliegen sie einem ständigen Erneuerungsprozess. Die verbrauchten Areale der OS werden vom RPE phagozytiert und entsorgt.

Kühne (1879) beschrieb erstmals zytoplasmatischen Strukturen im RPE des Frosches, welche er Myeloidkörperchen nannte. In Mammalia wurden vergleichbare Strukturen als lamellierte Lipidkörperchen bezeichnet (Porter und Yamada, 1960). Feeney, Griehaber und Hogan (1965) zeigten elektronenmikroskopisch, dass es sich um Photorezeptoraußensegmentfragmente handelt. Young (1967) beschrieb den Zusammenhang eines geordneten OS Umsatzes, so dass die OS Länge konstant gehalten wird.

Young und Bok (1960) beobachteten, dass die OS Fragmente im RPE von zwei separaten Zellmembranen umgeben sind und führten die Bezeichnung Phagosom ein, um deren Charakter zu unterstreichen. Die innere Membran stammt vom OS selbst und die äußere vom RPE. Die Formation von Aktinfilament enthaltenden Pseudopodia, welche das Außensegment umschlingen, spielt vermutlich einen entscheidenden Prozess bei der Abtrennung der OS Spitze. Doch ein aktiver Anteil am Prozess der Abschnürung der OS Spitze durch den Photorezeptor selbst ist wahrscheinlich (Besharse, et al. 1998, Bok 1985). Die Phagozytose erfolgt in Schüben, ausgelöst durch den Wechsel von der Dunkelheit zu Lichtverhältnissen oder zirkadianen Signalen (Young and Bok, 1969; LaVail, 1976). Wobei morgens bei Belichtung vor allem die Stäbchen und abends bei einsetzender Dunkelheit die Zapfen betroffen sind. Im Rhesusaffen werden täglich etwa 4000 Membranscheibchen pro RPE Zelle umgesetzt (Young, 1971a). Die Umsatzrate eines gesamten OS beträgt 10 Tage (Young, et al. 1969, Young 1971). Man kann die Phagozytose in vier Phasen einteilen: Erkennung, Anbindung, Aufnahme und Verdau der OS (Hall, et al. 1987). Unter anderem können Anbindung und Aufnahme in einem Meßsystem in vitro detektiert werden (Abb. 1.3; siehe auch Kapitel 3.8).

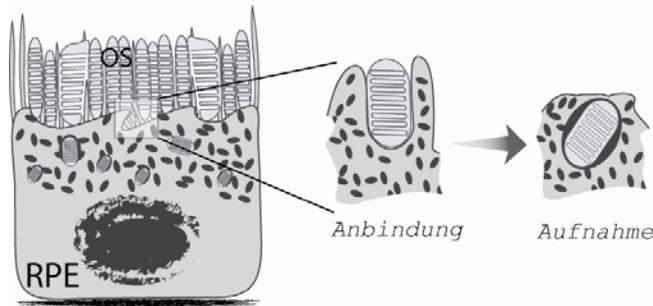


Abb. 1.3: Zwei Phasen der Photorezeptorphagozytose sind *in vitro* messbar. Die Anbindung der Photorezeptoraußensegmente (OS) an die RPE Zellmembran kann diskriminiert werden von der Aufnahme.

Die Phagozytose verbrauchter Photorezeptoraußensegmente (OS) durch RPE Zellen hat Analogien zur Phagozytose apoptotischer Zellen durch andere Phagozyten (Finnemann, et al. 1999, Hall, et al. 2005). Diese kann auch an isolierten RPE Zellen *in vitro* untersucht werden. Die Aufnahme von OS durch RPE Zellen scheint ein feinregulierter und spezifischer Prozess. Eine Spezifität der OS Phagozytose zeigt sich darin, dass die Phagozytose von Polystyrenmikro- und Karbonpartikeln (Edwards, et al. 1977, Reich-d'Almeida, et al. 1975a, 1975b) in OS phagozytosedefizienten RCS RPE Zellen unbeeinträchtigt ist. Weiterhin werden beschädigte OS regelmäßig von den RPE Zellen ignoriert (Custer, et al. 1975) und intakte OS werden präferiert gegenüber einer Reihe anderer Partikel (Mayerson, et al. 1986). In einer aktuellen Studie wurde auch erstmals eine Differenz der Phagozytose in Kombinationen von RPE und OS verschiedener Spezies berichtet (Kindzelskii, et al. 2004).

Beim Weitertransport der Phagosomen nach Aufnahme werden diese durch Mikrotubuli in den basalen Zellanteil transportiert (Burnside 1976). Dort reduziert sich die Phagosomgröße sehr schnell bis zum vollständigen Abbau. Die Inhibierung von Mikrotubuli mit Colchicine blockiert diesen Transport als auch die Bildung primärer Lysosome (Beauchemin, et al. 1977, Besharse, et al. 1982, Herman, et al. 1982, Keller, et al. 1977). Die Beteiligung von Aktinfilamenten als auch Mikrotubuli suggeriert, dass entsprechende Motorproteine bei der Phagozytose involviert sind.

### 1.3.2. Phagozytoserezeptoren

Die OS Phagozytose von RPE Zellen ist ein rezeptorvermittelter Prozess (Abb. 1.4). Kennzeichnend sind kompetitive Hemmbarkeit und die spezifische Sättigbarkeit durch OS (Hall, et al. 1987, Laird, et al. 1988, Mayerson, et al. 1986). Für die unterschiedlichen Schritte im Prozess der Anbindung bis zur Aufnahme scheinen bei der Phagozytose diverse Rezeptoren und Liganden eine Rolle zu spielen. Makrophagen zum Beispiel weisen Bindungsstellen für mindestens vierzig Liganden an ihrer Membranoberfläche auf, die im Zusammenhang mit einer Phagozytose stehen. (Wright, et al. 1983).

Beim RPE wurden bisher mindestens sieben eine Rolle bei der Phagozytose zugeschrieben. Die beiden bisher potentiellsten Funktionen konnten für Tyrosinkinase-rezeptor c-mer (MerTK) und die  $\alpha\beta 5$  Integrine gezeigt werden. Die Phagozytoseleistung ist dramatisch verringert, wenn einer von beiden funktionslos ist (Hall, et al. 2001, Nandrot, et al. 2004b). Fehlen besagte Integrine in einem genetisch veränderten Mausmodell kommt es zum Verlust der zirkadian gesteigerten Phagozytose und einer altersassoziierten Lipofuszinakkumulation, die ein Merkmal der AMD darstellt (Algvere, et al. 2002). Mutationen im MerTK Gen führen zum Phagozytosedefekt in RPE Zellen (Dufour, et al. 2003, Feng, et al. 2002) und damit zur Degeneration der Photorezeptoren und resultierender Erblindung beim Menschen (D'Cruz, et al. 2000, Duncan, et al. 2003a, Gal, et al. 2000, McHenry, et al. 2004). Eine Beteiligung von MerTK wurde auch als Rezeptor bei anderen Phagozyten (Wu, et al. 2005) und Erkrankungen aufgrund eines Phagozytosedefektes identifiziert (Cohen, et al. 2002).

Die klassischen Phagozytoserezeptoren Fc Fragment des Immunoglobulin G Molekül und Komplement sind am RPE für die Phagozytose funktionell präsent, spielen aber eventuell keine Rolle bei der spezifischen OS Phagozytose (McLaughlin, et al. 1994). Die Rolle eines Mannoserezeptors ist noch umstritten, aber verschiedene Formen der Antagonisierung reduzierten Anbindung und Aufnahme (Hall, et al. 1991a, Lutz, et al. 1995, McLaughlin, et al. 1994, Wilt, et al. 1999a, Wilt, et al. 1999b). Eine wichtige Funktion wird für den CD36 Rezeptor diskutiert, die genauen Form der Beteiligung ist aber noch ungeklärt (Ryeom, et al. 1996a, Ryeom, et al. 1996b, Sparrow, et al. 1997). Erste Untersuchungen zeigen, dass CD36 initial nicht beteiligt ist und möglicherweise während des Phagozytoseprozesses die Aufnahme rate moduliert (Finnemann, et al. 2001). Der neueste Kandidat stellt der Toll like Rezeptor 4 (TLR4) dar, welcher mit CD36 und OS kolokalisiert (Kindzelskii, et al. 2004, Kumar, et al. 2004). TLR4 Polymorphismen im RPE wurden im Zusammenhang mit der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) gebracht (Zarepari, et al. 2005b).

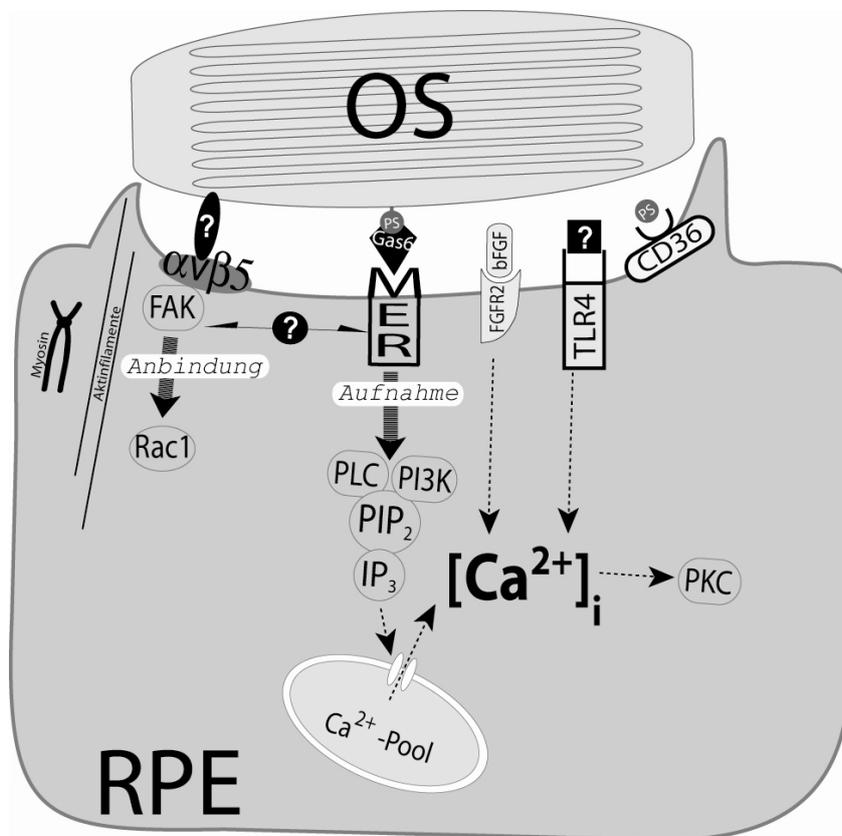


Abb. 1.4:

Schemazeichnung der bekannten Zellmembranrezeptoren und intrazellulären Signalwege, die bei der Phagozytose durch RPE Zellen an der Regulation der Anbindung und Aufnahme von Photorezeptoraußensegmenten (OS) potentiell beteiligt sind. Es soll deutlich werden, dass die genauen Mechanismen noch unverständlich sind.

In Bezug auf die Funktion der Rezeptoren ist die Hypothese nach der derzeitigen Datenlage, dass αvβ5 Integrine die Anbindung und mögliche Potenzierung (Finnemann, et al. 1997a) des MerTK Signals, der die Aufnahme signalisiert (Hall, et al. 2005), vermitteln. Die funktionellen Liganden der Phagozytose von RPE Zellen in vivo sind noch nicht geklärt. Potentielle Kandidaten sind die Serumbestandteile Gas6 und Protein S, die in vitro über MerTK die Phagozytoseaufnahme stimulieren. Möglicherweise kommunizieren im Gesamtprozess die Rezeptoren miteinander (Finnemann 2003b).

### 1.3.3. Systeme sekundärer Botenstoffe

Die Transmission von Signalen ausgelöst durch Ligandenbindung an OS spezifische Phagozytose-rezeptoren sowie durch weitere Modulatoren werden durch unterschiedliche sekundäre Botenstoffe vermittelt (Abb. 1.4). Potentielle Mechanismen dieser Rezeptorsysteme sind die phagozytische OS Anbindung, Pseudopodienbildung sowie OS Aufnahme durch Akkumulation polymerisierter Aktinfilamente, Modulation durch Transmittersekretion, Exozytose und Phagolysosomfusion. An einem Teil dieser Prozesse sind vermutlich sowohl  $\alpha\beta 5$  Integrine durch Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) als auch die Ligation von MerTK beteiligt. Letzteres führt zur Autophosphorylierung und zur Transduktion eines extrazellulären Signals durch Initialisierung diverser physiologischer Prozesse wie der Aktivierung des Phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) Signalwegs (Hall, et al. 2003b) und Phospholipase C (PLC) (Rodriguez de Turco, et al. 1992).

DAS INOSITOLTRIPHOSPHAT (INS $P_3$ ) SYSTEM ist an MerTK gekoppelt und ist eine wesentliche Signalkaskade für die Phagozytose. Eine PLC Aktivierung führt zur Bildung von InsP3 und Diacylglycerol (DAG). Ein Anstieg der intrazellulären InsP3 Konzentration korreliert mit vermehrter Proteinphosphorylierung (Heth, et al. 1992) und mit dem Beginn der OS Phagozytose (Heth, et al. 1994, Rodriguez de Turco, et al. 1992). Diese Initiierung bedarf einer Tyrosinphosphorylierung (Finnemann 2003b) und das InsP3 Signal führt auch zum Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ . Ein finaler  $[Ca^{2+}]_i$  Anstieg ist letztlich auch ein Terminationsignal der Phagozytose (Hall, et al. 1991b).

KALZIUMSIGNALE ( $Ca^{2+}$ ) scheinen sehr vielseitig in der Regulation von Prozessen im Zusammenhang der Phagozytose involviert zu sein. RPE Zellen weisen verschiedenste Kalziumspeicher und auch Kalziumionenkanäle auf. Deren Beteiligung an den unterschiedlichen Formen von Kalziumsignalen: Intrazellulärer Kalziumanstieg in der gesamten Zellen mit teils biphasischer Natur (Kuriyama, et al. 1991, Kuriyama, et al. 1992, Mergler, et al. 2002, Mitchell 2001, Peterson, et al. 1997, Sullivan, et al. 1997), wellenförmige Ausbreitung (Gomes, et al. 2003, Himpens, et al. 1999, Himpens, et al. 2000, Stalmans, et al. 1997, 1998, 1999) oder Oszillationen (Kindzelskii, et al. 2004), sind nicht bekannt. Die Messung kompartmentärer Signale ist bisher noch nicht ausgiebig durchgeführt worden, aber ein paraphagosomales Kalziumsignal wurde beobachtet (Kindzelskii, et al. 2004).

Die Initiierung der Phagozytose führt zum genannten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  aber ein vermehrter Anstieg führt zur Termination (Hall, et al. 1991b). Der InsP3 induzierte  $Ca^{2+}$  Anstieg könnte aus intrazellulären Speichern und /oder über eine Aktivierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen am RPE zustande kommen (Mergler, et al. 2002). RPE Zellen exprimieren Kalziumkanäle (Rosenthal, et al. 2001, Sakai, et al. 1997, Strauss, et al. 1994b, Ueda, et al. 1993, 1995). Tyrosinphosphorylierung und stimulierte PKC Aktivität führt zur erhöhten Kalziumkanalleitfähigkeit (Mergler, et al. 1998, Rosenthal, et al. 2002, Strauss, et al. 1997, Strauss, et al. 2000). Es ist nicht klar, ob ein Kalziumeinstrom durch Ionenkanäle an Prozessen um die Phagozytose oder direkt an OS Anbindung- und Aufnahmeregulation beteiligt ist. Extrazelluläres Kalzium ist notwendig für den Ablauf der Phagozytose (Greenberger, et al. 1983) und benötigt für die Bindung von Gas6 als Ligand des MerTK (Hall, et al. 2002). Auch L-Glutamat führt zur Steigerung von InsP3 in der Zelle und dieser Effekt wird durch L-Typkanalblockade inhibiert (Fragoso, et al. 1999). Für eine Reihe weiterer Signaltransmitter wurde eine Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  beschrieben (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b). Exogenes Adenosin triphosphat (ATP) zum Beispiel steigert  $[Ca^{2+}]_i$  unabhängig von extrazellulärem Kalzium und inhi-

biert die Phagozytose (Mitchell 2001). Exogene Zytokine wie TGF $\beta$ , FGF1 und FGF2 modulieren die Phagozytose unterschiedlich (Hayashi, et al. 1996, McLaren, et al. 1997, Sheu, et al. 1994).

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF), ein Wachstumsfaktor, der sowohl über den Rezeptor FGFR1, als auch über FGFR2 wirken kann, führt zum  $[Ca^{2+}]_i$  Anstieg in RPE Zellen wenige Minuten nach der Bindung, der nach 30 Minuten maximal ist (Kuriyama, et al. 1991, Mergler, et al. 1998, Mitchell 2001). bFGF induziert eine relativ schnelle Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  mit einer maximalen Steigerung um 20 %, die sowohl aus intra- als auch extrazellulären  $Ca^{2+}$  besteht (Kuriyama, et al. 1991). Desweiteren führt bFGF auch zum Anstieg von InsP3 innerhalb von einer Stunde (Kuriyama, et al. 1991). Retinales Pigmentepithel sezerniert bFGF (Bost, et al. 1992, Kitaoka, et al. 1993) und es ist bekannt, dass der FGFR2 Rezeptor direkt mit Cav1.3 L-Typ Kalziumkanälen interagieren und diese durch Tyrosinphosphorylierung stimulieren kann (Strauss, et al. 2000). Der Effekt einer kurzen bFGF Applikation auf die OS Phagozytose ist nicht bekannt, aber für eine Inkubation von 24 Stunden gibt es widersprüchliche Berichte (Hayashi, et al. 1996, McLaren, et al. 1997).

ZYTOSOLISCHE PROTEINKINASEN sind die entscheidenden Signaltransmitter im Phagozytoseablauf. Am RPE korreliert Proteinphosphorylierung mit dem Phagozytosebeginn. Ein wichtiges Ziel dieser Phosphorylierungen ist das Zytoskelett.

Mutationen in Genen von Myosin VIIa sind beim Menschen mit Syndromen assoziiert, die mit einem Phagozytosedefekt einhergehen und zur retinalen Degeneration führen (Heth, et al. 1991a). Zytoskelettproteine werden auf vielfache Weise in der Zelle reguliert. Unter anderem phosphoryliert die Calmodulin Kinase (CaM) Myosinleichtketten, die dann mit Aktin interagieren (Bronstein, et al. 1988). Die CaM Inhibition reduziert die Phagozytose von RPE Zellen (Miceli, et al. 1997a). Ebenso kommt es bei MerTK Mutationen zu Mischphosphorylierungen (Heth, et al. 1992) und Phagozytosedefekt (D'Cruz, et al. 2000, Feng, et al. 2002, Gal, et al. 2000).

Die Serin- /Threoninkinasen Proteinkinase A (PKA) sowie verschiedene Proteinkinase C (PKC) Subtypen (Moriarty, et al. 2000, Wood, et al. 1998) und die zytosolische Proteintyrosinkinasen (PTK) pp60<sup>c-src</sup> (Koh 1992) sind in RPE Zellen vorhanden. Die Initiierung der Phagozytose korreliert wie gesagt mit dem Anstieg der InsP3 bedingten Proteinphosphorylierung und des  $[Ca^{2+}]_i$  Anstiegs. Die  $Ca^{2+}$  abhängige Aktivierung von Proteinkinasen und anderen Proteinen verändern den Zellmetabolismus und dienen als Anschaltssignal der Phagozytose (Miceli, et al. 1997b, Rodriguez de Turco, et al. 1992). Andererseits führt eine Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  als auch DAG aus dem InsP3 Signalweg zur Aktivierung von Proteinkinasen C, die als ein Ausschalt- oder Anschaltssignal dienen können (Finnemann, et al. 1999, Hall, et al. 1991b). Aktin, ein Hauptprotein des RPE (Haley, et al. 1983), wird benötigt im Prozess der OS Anbindung vermittelt durch  $\alpha\beta 5$  Integrine und ist ein potentielles Ziel der PKC (Heth, et al. 1988). Die genauen Funktionen und Zielproteine der PKC Subtypen sind ungeklärt. Transmitter wie Adenosin, Adrenalin, Dopamin und Melatonin beeinflussen die Phagozytose von RPE Zellen vermutlich über G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Adenylzyklaseaktivität und damit die Produktion von zyklischem 3',5'-Adenosine Monophosphat (cAMP) modulieren (Nguyen-Legros, et al. 2000). Es besteht die Hypothese, dass Änderungen der cAMP Konzentration und nicht die Gesamtkonzentration das Mass der Modulation darstellen. Ein cAMP Anstieg inhibiert (Hall, et al. 1993) und eine Reduktion steigert die OS Phagozytose (Edwards, et al. 1980). Die Beteiligung sekundärer Botenstoffe der Phagozytoseregulation ist nicht vollständig verstanden.

## 1.4. Pathophysiologie – RPE Phagozytosedefekt

### 1.4.1. Einführung

Bis heute wurden zwei Genmutationen aufgedeckt, welche durch einen Phagozytosedefekt zur Retinadegeneration führen. Die Erstbeschreibung eines solchen Phagozytosedefektes betraf ein spontanes Tiermodell für Retinitis Pigmentosa, die Royal College of Surgeons oder kurz RCS Ratte (Bok, et al. 1971, Bourne, et al. 1938, Bourne, et al. 1939, Boyle, et al. 1991, Chaitin, et al. 1983b, Edwards, et al. 1977). Der genetische Defekt führt zur Synthese eines verkürzten funktionslosen MerTK Proteins. Vergleichbare Mutationen von MerTK wurden auch beim Menschen mit autosomal rezessiver Retinitis Pigmentosa gefunden (Gal, et al. 2000, Kumar 2001, McHenry, et al. 2004, Thompson, et al. 2002). Durch diesen Defekt kommt es zu Ablagerungen von Zelltrümmern im subretinalen Raum, die sowohl eine Mangelversorgung der Photorezeptoren als auch die Bildung toxischer Substanzen durch Photooxidation zur Folge hat. Die Photorezeptoren gehen an Apoptose zugrunde (Tso, et al. 1994). Bei Mäusen mit der entsprechenden Mutation (Duncan, et al. 2003a, Duncan, et al. 2003b) kommt es ab dem achten Tag zur Anhäufung nicht phagozytierter OS. Ab einem Alter von 18 Tagen kann die Degeneration histologisch und elektroretinographisch beobachtet werden. Sie ist vollständig nach 3 Monaten (Dowling, et al. 1962, Herron, et al. 1969, Tamai, et al. 1979). Mittlerweile konnte durch Gentherapie (Duncan, et al. 2003a, Duncan, et al. 2003b, Tschernutter, et al. 2005, Vollrath, et al. 2001) und Transplantation funktioneller RPE Zellen (Coffey, et al. 2002, Grisanti, et al. 2002, Lin, et al. 1996, Little, et al. 1996, Little, et al. 1998) oder Irispigmentepithelzellen (IPE) (Schraermeyer, et al. 1999b, Schraermeyer, et al. 2000) im frühen Krankheitsstadium eine Verlangsamung des Degenerationsgeschehen durch eine Verbesserung der Phagozytoseleistung erzielt werden.

Ein anderer Defekt der Phagozytose durch RPE Zellen kann vielleicht auch die Retinadegeneration in Usher Typ 1 B Patienten verursachen (Gibbs, et al. 2003). Das Ushersyndrom ist ein erblicher Verlust des Hör- und Sehvermögens (Ahmed, et al. 2003, Eudy, et al. 1999, Keats, et al. 1999, Kimberling, et al. 2000, Petit 2001). Das Genprodukt des Usher Typ 1B Gens ist Myosin VIIa. Initial wurde dieser Defekt in einem gestörten vesikulären Transport von OS Komponenten vermutet (Hasson 1999). Bei Myosin VIIa defizienten Mäusen ist die OS Aufnahme bei normaler Anbindung reduziert, der Vesikeltransport und die Fusion von Phagosom mit Lysosom gestört (Gibbs, et al. 2003).

Eine Beteiligung der OS Phagozytose wird auch schon seit längerem am Beginn und der Progression der altersabhängigen Makuladegeneration diskutiert (Boulton 1991, Sarangarajan, et al. 2005). Die altersbedingten Veränderungen in der Retina gehen mit einem Zellverlust, einem gesteigerten Phagozytoseaufgabe und metabolischen Belastung der RPE Zelle insbesondere in der Makula (Boulton, et al. 1994, Boulton 2001, Burke, et al. 1988, Dorey, et al. 1989). Dies führt möglicherweise zur präferentiellen Ansammlung von Lipofuszin in der Makula und verursacht ultimativ RPE Atrophie und Photorezeptordegeneration (Besch, et al. 2003, Boulton 1991, 1998, 2001). In jüngeren Studien häufen sich jetzt auch Hinweise auf Riskiokandidatengene für altersabhängige Makuladegeneration. Es wurden einerseits Gene identifiziert, die für mögliche oder bekannte Proteine im Phagozytoseprozess codieren. Und andererseits wurden Beobachtungen in genetisch veränderten Tiermodellen gemacht, bei denen ein Funktionsverlust ausgewählter Proteine der Phagozytoseregulation mit altersabhängiger Blindheit oder pathomorphologischen Korrelaten der AMD einherzugehen scheinen (Ambati, et al. 2003, Edwards, et al. 2005, Haines, et al. 2005, Kindzelskii, et al. 2004, Klein, et al. 2005, Lahiri, et al.

1993, Nandrot, et al. 2004b, Rakoczy, et al. 2002, Zarepari, et al. 2005a). Außerdem wurde gezeigt, dass Lipofuszin als pathomorphologisches Korrelat der AMD sowie oxidativer Stress die OS Phagozytose beeinträchtigen können (Bergmann, et al. 2004, Nilsson, et al. 2003, Schutt, et al. 2001). Durch Oxidation und Lichtstress veränderte OS können nur unvollständig im RPE abgebaut werden und somit zu Veränderungen im Zellmetabolismus führen, die eine Progression der AMD fördern (Higgins, et al. 2003). Die Hauptkomponente des fluoreszierenden Lipofuszin Anteils ist N-Retinylden-N-Retinyethanolamin, kurz A2E, welches den OS Abbau reduziert (Finnemann, et al. 2002).

#### **1.4.2. Pathomechanismen eines Phagozytosedefektes**

RCS RPE ist trotz funktionsloser MerTK noch zur Phagozytose im Stande. Dabei konnte in vivo unter zirkadianen Bedingungen eine Restleistung von 5 % nach Lichtreizung gemessen werden (Goldman, et al. 1978). Der besagte Phagozytosedefekt kann auch in vitro untersucht werden. Obwohl die OS Anbindung unverändert stattfindet, werden weniger als 20 % der angebotenen OS Menge in vitro aufgenommen. Normalerweise werden 70 bis 80 % der OS Menge phagozytiert (Chaitin, et al. 1983b). So werden OS Partikel gebunden, aber nur teilweise von Membranausstülpungen, so genannten Pseudopodia (Matsumoto, et al. 1987), umschlungen. Dies zeigt sich durch eine stark verringerte Ansammlung von Netzwerken aus Aktinfilamenten unterhalb der RPE Zellmembran mit angebondenen OS (Chaitin, et al. 1983a). Aktin könnte das verantwortliche Filament im kontraktilem Apparat der OS Aufnahme sein (Bok 1985, Burnside, et al. 1976, Burnside 1976). Dieser scheint prinzipiell aufgrund der noch restlichen Phagozytoseleistung noch intakt zu sein (Chaitin, et al. 1983a, Chaitin, et al. 1984). Der funktionslose MerTK Rezeptor verhindert die transmembranäre Signalisierung zur Aktivierung der Aufnahmesysteme in die Zellen.

Das Studium dieses Tiermodells erbrachte neue Erkenntnisse in Bezug auf den physiologischen und pathophysiologischen Prozess der OS Phagozytose durch RPE Zellen (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b). In Studien wurden Veränderungen in der Genexpression von über 100 Genen im RCS RPE identifiziert (Dufour, et al. 2003, Malfait, et al. 2001, McLaren, et al. 1996, Rakoczy, et al. 1993, Sheedlo, et al. 2002, Sparrow, et al. 1997, Van Den Berghe, et al. 2004).

Funktional zeigten sich Veränderungen in der Endomembranogenese, Endozytose, Transzytose, Exozytose, Vesikeltransport und weiteren RPE Metabolismen.

Ob alle Veränderungen initial durch die MerTK Mutation bedingt sind oder ob auch Folgeveränderungen im Prozess der retinalen Degeneration beteiligt sind, ist nicht geklärt. Diese Daten dienen als Grundlage, um die Regulation der Phagozytose in patho- und physiologischer Situation zu studieren.

Es ist noch ungelöst, ob zwei oder mehr unterschiedliche Phagozytosemechanismen im RPE bestehen oder ob in Abhängigkeit der jeweiligen Liganden auf der Oberfläche der zu phagozytierenden Partikel die Phagozytose moduliert wird. Es stellt sich zum Beispiel die Frage, ob bei MerTK Defekt lediglich eine verlangsamte oder gar eine unspezifische Phagozytose vorhanden bleibt. Das bei der OS Anbindung beteiligte Integrin  $\alpha\beta 5$  ist jedenfalls noch aktiv an RCS RPE Zellen, so dass dessen Blockierung mittels Antikörpern die Phagozytose noch weiter reduzieren kann (Finnemann 2003b).

In einer Reihe von unterschiedlichen Systemen von sekundären Botenstoffen wurden diverse Veränderungen im Phagozytoseprozess auf funktioneller Ebene beschrieben. So wurden die Zellen studiert bevor ein pathomorphologisches Korrelat von zerfallenden OS anfällt. Ausgangspunkt ist, dass die

Stimulation der Phagozytose mit den auch im Serum enthaltenen MerTK Liganden Gas6 und Protein S defizient ist (Chaitin, et al. 1983b, Edwards, et al. 1986, Hall, et al. 1987, Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2005). Die durch OS am RPE ausgelöste Proteinphosphorylierung ist verändert (Heth, et al. 1992) (Heth, et al. 1991b). Veränderungen im Metabolismus von zyklischem Guanosinmonophosphat (Lolley, et al. 1976) und eine Reduktion in der cAMP Antwort durch Stimulation mit speziellen Agonisten sind gezeigt worden (Gregory, et al. 1992, Nash, et al. 1995).

Das InsP3 /  $Ca^{2+}$  System ist bei der Initiierung der OS Aufnahme essentiell beteiligt (Heth, et al. 1994). Der InsP3 Anstieg nach OS Applikation findet in RCS RPE Zellen nicht statt (Heth, et al. 1994). Carbachol stimuliert InsP3 in Kontrollzellen und führt damit zu einer Reduktion der Phagozytose. In RCS RPE hingegen wird der InsP3 Signalweg ebenfalls mit Carbachol stimuliert, jedoch verändert sich die Phagozytose dadurch nicht (Hall, et al. 1996b). Eine durch InsP3 ausgelöste Phagozytose findet im RCS RPE nicht statt, aber der Zusammenhang mit einer möglichen Änderung der  $[Ca^{2+}]_i$  ist bisher nicht untersucht. Erhöhtes  $[Ca^{2+}]_i$  ist ein Signal zur Aktivierung von Proteinkinasen sowie anderen  $Ca^{2+}$  abhängigen Proteinen (Rosenthal, et al. 2001, Rosenthal, et al. 2002) und in allen genannten Systemen sind Misregulationen beschrieben worden.

Proteinkinase C ist an der Regulation der Phagozytose von RPE Zellen komplex beteiligt (Finnemann 2003b, Hall, et al. 1991b) und die Expression der PKC Subtypen ist verändert (Wood, et al. 1998). Die durch PKC oder Tyrosinkinasen bewirkte Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  Antwort nach mechanischer Stimulation ist verändert (Stalmans, et al. 1998), wobei diese Antwort per se schon verringert und verlangsamt ist in RCS RPE Zellen (Stalmans, et al. 1999). Eine verringerte Expression von Konnexinproteinen (bilden Zell-Zellkontakte), die eine metabolische und ionale Kopplung zwischen benachbarten Zellen ermöglichen und auch durch PKC reguliert werden, könnten eine der Ursachen sein (Malfait, et al. 2001). Außerdem scheint die Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  in Abhängigkeit des InsP3 Systems gestört zu sein (Strauss, et al. 1998b).

Eine veränderte Modulation durch  $Ca^{2+}$ , InsP3, Tyrosinkinasen oder PKC zeigte sich auch in der Modulation von Zellmembranionenkanälen. RCS RPE Zellen weisen eine gesteigerte Leitfähigkeit und veränderte Regulation neuroendokriner L-Typ Kalziumkanäle (Cav1.3) auf (Strauss, et al. 1993). Dieses hat unter anderem Konsequenzen für die Reaktion der Zelle auf einen InsP3 Anstieg (Strauss, et al. 1996). Die Basiskalziumkonzentration in RCS RPE Zellen ist nicht verändert (Mergler, et al. 1998). Doch die Modulation der  $[Ca^{2+}]_i$  ist beeinträchtigt (Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 1996). Inwieweit die Regulation der  $[Ca^{2+}]_i$  im Zusammenhang steht mit der beeinträchtigten Phagozytoseleistung im RPE ist genauso wenig geklärt, wie die Rolle von  $Ca^{2+}$  in der physiologischen Phagozytoseregulation.

Eine Reihe von Untersuchungen an der RCS Ratte zeigten, dass bFGF eine besondere Rolle in der Pathogenese spielt (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b). Eine frühe Veränderung ist die verringerte bFGF Sekretion durch das RCS RPE (McLaren, et al. 1996). Es ist besonders interessant, dass bFGF sich bisher als einziges Agens, neben der Gentherapie und Zelltransplantation, erwiesen hat, die Retinadegeneration in der RCS Ratte zu verzögern. Zusätzlich zu einer neuroprotektiven Funktion (Faktorovich, et al. 1990, Neuner-Jehle, et al. 2000) kann bFGF auch den funktionellen Phagozytosedefekt der RPE Zellen in geringem Masse in vitro wiederherstellen (McLaren, et al. 1997). Eine 24 Stunden bFGF Vorinkubation führt zu einer signifikanten Stimulation der Phagozytoseleistung (McLaren, et al. 1997).

## 2. Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit

**Z**iel dieser Arbeit ist es 1) eine Methode zur Messung der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch retinale Pigmentepithelzellen (RPE) *in vitro* zu etablieren. Mit dieser Technik sollen 2) zu Beginn Daten über den Einfluss von Zellkulturmedien sowie komplexen Mediensupplementen gewonnen werden, um schließlich mit dem Messsystem 3) Untersuchungen zur Patho- /Physiologie der Phagozytose durch RPE und RCS-RPE Zellen durchzuführen.

Dazu stellten sich eine Reihe an Aufgaben und Fragen:

Zu 1)

- Eine Methode zur Messung der Phagozytose durch RPE Zellen soll einen hohen Probendurchsatz, Wiederholungen der Variablen und die Messung von OS Anbindung und Aufnahme ermöglichen.
- Eine permanente RPE Zelllinie soll hinsichtlich ihrer Validität für die Untersuchung der OS spezifischen Phagozytose durch RPE Zellen charakterisiert werden.

Zu 2)

- Der Einfluss von serumfreien und -haltigen Zellkulturmedien auf die Phagozytose soll studiert werden, auch um das *in vitro* System für die weiteren physiologischen Experimente zu validieren.
- Ein Retinaextrakt (RE) und ein choroideakonditioniertes Medium (ChCM) sollen untersucht werden.

Zu 3)

Der Ausgangspunkt der Experimente zur Patho- / Physiologie der Phagozytose ist, dass die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  ein elementares Signal in der Phagozytosemodulation darzustellen scheint (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b). Das  $\text{InsP}_3$  / $\text{Ca}^{2+}$  System zum Beispiel wurde mit der Initialisierung sowie Terminierung der Phagozytose in Zusammenhang gebracht (Hall, et al. 1991b, Hall, et al. 2002, Heth, et al. 1994, Rodriguez de Turco, et al. 1992). Ein potentieller Weg für einen  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom und damit die Modulation der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stellen durch Tyrosinkinasen regulierte L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle im RPE dar (Strauss, et al. 1994b, Ueda, et al. 1993, 1995). Experimente deuten auf eine strukturelle Interaktion des Rezeptorsubtyp 2 (FGFR2) des basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und der zytosolischen Proteintyrosinkinase (PTK) pp60<sup>c-src</sup> mit L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen im RPE hin (Rosenthal, et al. 2001, Strauss, et al. 2000).

Bei RPE-Zellen von RCS Ratten liegt ein Phagozytosedefekt aufgrund funktionsloser Rezeptortyrosinkinase Mer (MerTK) vor. Dies führt u.a. zu einer erhöhten Leitfähigkeit von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen.

- Sind MerTK und der Ligand Gas6 an der OS Phagozytose durch RPE Zellen *in vitro* beteiligt?
- Sind spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle an der Regulation der Phagozytose beteiligt?
- Wie beeinflusst bFGF und pp60<sup>c-src</sup> die Phagozytose?
- Beeinflussen Blockierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen, bFGF Applikation und Inhibierung von pp60<sup>c-src</sup> auch die Phagozytose durch RCS-RPE Zellen?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Chemikalien und Lösungen

Reagenz	Hersteller
Amphotericin B	-Biochrom
bFGF = FGF-2	-Biochrom
5-(and -6) carboxy SNAFL®-2, succinimidyl	-Molecular Probes C-3062
Cellfix™	-Becton Dickinson
Complete™	-Boehringer
L-Cystein	-Sigma
FCS	-Biochrom
Fibronectin (bovine)	-Gibco BRL Life Technologies
Gentamycin	-Gibco BRL Life Technologies
Herbimycin A	-Sigma
Insulin, bovine	-Sigma
Kollagenase IA, IV	-Sigma (C-9891, C-5138)
Natriumpyruvat	-Biochrom
Nifedipine	-Sigma
Papain	-Sigma (P-3125)
PBS w Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	-Biochrom

Alle darüber hinaus verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck und Sigma bezogen.

##### 3.1.2. Material für die Immunhistochemie

Reagenz	Hersteller
Aquatex	Merck
BSA (bovines Serumalbumin)	Boehringer
Dimethylformamid	Merck
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Proteinase K	DAKO
Kaninchen Anti Ziegen IgG, AP konjugiert	-Biermann, #RA026
Anti-Ziegen Ig, FITC konjugiert	-DAKO
Kaninchen IgG, Negativkontrolle	-DAKO
Ziege-Anti-Human Gas 6, (polyklonal)	-Santa Cruz Biotechnology
Ziege-Anti-Maus Mer, (polyklonal)	-Santa Cruz Biotechnology

##### 3.1.3. Material für die Zellisolierung und -kultur

Bezeichnung	Hersteller
Bottletop Filter (0,22µm Porengröße)	Millipore
Chamber Slides	Nunc
Kulturschalen	Costar
Kulturschalen 96-Loch	Greiner
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene™
Pipettenspitzen, silikonisiert	Biozym
Schwarzbandfilter Nr. 589, 0.00002g	Schleicher & Schüll
Steriflip Vakuum Filter	Becton Dickinson
Zellsieb, 70µm, Nylon	Falcon
Zentrifugenröhrchen Polyallomer	Beckman

### 3.1.4. Zellkulturmedien

Reagenz	Hersteller
D-MEM (Na-Pyr., 1000mg/L Glucose, #41966)	-Gibco BRL Life Technologies
Endothelial-SFM (mit L-Glutamin)	-Gibco BRL Life Technologies
Human Endothelial-SFM System (Kit)	-Gibco BRL Life Technologies
Ham's F12 (mit L-Glutamin, #21700)	-Gibco BRL Life Technologies
Medium 199 (Earle's Salzen, L-Glut, #31100)	-Gibco BRL Life Technologies
MEM (mit Earle's Salzen, L-Glutamin, #31095)	-Gibco BRL Life Technologies

### 3.1.5. Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Coulter Particle Count + Size Analyser Z2	Beckman Coulter
Doppelstrahl Spektralphotometer	Shimadzu
Einbettautomat	Shandon Citadel 2000
Invertmikroskop Leitz Fluovert	Leica
Kamerasystem MPS 51	Wild
Homogenisator	Braun Melsungen
Lyophilisator Lyovac GT2 + Concentrator	Leybold Heraeus
Minizentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf
Multi-Loch Reader CytoFluor® Series 4000	PerSeptive Biosystems
Ultrazentrifuge XL80	Beckman
Zentrifuge Sorvall SA600	Sorvall

## 3.2. Zellkulturmedien und -supplemente

### 3.2.1. Basalmedium F99

**D**as Basalmedium F99 besteht aus einer 1:1 Mischung von Medium 199 und Ham's F12 Nutrient Mixture. Für die Herstellung wurden folgende Mengen der Pulvermedien abgewogen:

9.875 g/l Medium 199

10.625 g/l Ham's F12

Sie wurden dann in 2 Liter Aqua destillata gelöst und für 2 h gerührt. Nach Zugabe von:

3.375 g/l NaHCO<sub>3</sub>

und weiterem Rühren sollte der pH-Wert bei  $7.40 \pm 0.05$  liegen. War dies nicht der Fall, konnte mit NaOH 1 M oder HCl 1 M nachgestellt werden. Das Medium wurde anschließend sofort sterilfiltriert (Porengröße 0.22 µm) und bei +4 °C gelagert.

### 3.2.2. Gewinnung von Chorioidea konditioniertem Medium (ChCM)

Nach Präparation der Uvea aus humanen Spenderbulbi (siehe 3.2.2) und Inkubation in Kollagenase für 16 h wurde das uveale Gewebe in Medium F99 mit 1 % FCS (je 2 ml /Bulbus) überführt. Die Uvea wurde für weitere 4 Tage inkubiert, anschließend wurde das Gewebe abzentrifugiert (x100 g, 5 min) und der Überstand wurde als ChCM bei -20 °C gelagert (Engelmann, et al. 2004).

### 3.2.3. Herstellung von Retinaextrakt (RE)

Die Herstellung erfolgte nach der Methode von Pfeffer et al. (1990). Dazu wurden 10 humane neurosensorische Retinae aus Spenderbulbi in 50 ml PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei) unter Zusatz von Proteasehemmern (Complete™ Protease Inhibitor Cocktail) auf Eis homogenisiert und das Homogenisat wurde bei 4° C zwei Stunden vorsichtig geschwenkt. Dann wurde für 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und das Zentrifugat weitere 45 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut verworfen und das Zentrifugat sterilfiltriert und in Aliquots bei -20 °C eingefroren. Der so hergestellte RE ist 100x konzentriert.

### 3.2.4. Wachstumsmedien F99<sub>RPE</sub> und F99<sub>RPE</sub> sine ChCM

Die Wachstumsmedien F99<sub>RPE</sub> und F99<sub>RPE</sub> sine ChCM basieren auf dem von Sobottka-Ventura et al. (1996) entwickelten Medium zur Kultivierung humaner RPE Zellen und enthalten:

15 %	ChCM (Chorioidea konditioniertes Medium; nur F99 <sub>RPE</sub> )
10 %	FCS (Fetal Calf Serum), fetales Kälberserum
1 mM	Natriumpyruvat
1 µg /ml	Insulin
50 µg /ml	Gentamycin 10 mg/ml
2,5 µg /ml	Amphotericin B
ad 500 ml	Basalmedium F99

Für das Medium F99<sub>RPE</sub> sine ChCM wurde lediglich der ChCM Zusatz durch Basalmedium F99 ersetzt. Das Medium F99<sub>RPE</sub> RE wurde aus F99<sub>RPE</sub> sine ChCM supplementiert mit 1 % RE hergestellt.

## 3.3. Lösungen

### 3.3.1. Bradford Reagenz (Bradford 1976)

Für das Farbreagenz wurden:

100 mg	Coomassie Brilliant Blue G250
50 ml	95 % Ethanol + 100 ml 85 % Phosphorsäure (w/v)

mit H<sub>2</sub>O bidestillata auf 1 l aufgefüllt. Das Reagenz wurde mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.3.2. Photorezeptoren – Einfrierlösung

Die Einfrierlösung zur Kryokonservierung isolierter Photorezeptoren (OS) bei -80 °C wurde nach der Methode von Finnemann et al. (1997a) hergestellt und besteht aus

10.0 mM	Phosphatpuffer Na <sub>2</sub> HPO <sub>3</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub> (pH 7.2)
0.1 mM	NaCl
2.5 %	Sucrose (w/v)

Die Lösung (pH7.2) wurde durch einen Filter mit 0,22 µm Porengröße filtriert um sie zu sterilisieren.

### 3.3.3. pH 9.0 Überdeckungslösungen

Die pH 9.0 – Überdeckungslösung wurde nach der Rezeptur von Miceli und Newsome (1994) hergestellt. Die PBS Lösung wurde mit 24 mM NaHCO<sub>3</sub> auf einen pH-Wert von 9.0 eingestellt und es wurde 10 % Glycerol hinzugegeben. Die Lösung wurde bei +4 °C gelagert.

### 3.3.4. Pucksche Lösung

Die Lösung wurde nach der Rezeptur von Puck et al. (1958) wie folgt hergestellt:

130.0 mM	NaCl
3.8 mM	KCl
0.6 mM	MgSO <sub>4</sub>
0.1 mM	CaCl <sub>2</sub>
0.1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0.6 mM	KHPO <sub>4</sub>
14.3 mM	NaHCO <sub>3</sub>
5.6 mM	Glucose

Die Lösung (pH 8.0) wurde durch einen Filter mit 0.22 µm Porengröße filtriert, um sie zu sterilisieren.

### 3.3.5. Pufferlösung für den Sucroседichtegradienten

Die Pufferlösung für den Sucroседichtegradienten wurde nach Molday et al. (1987) hergestellt und

enthält:	130 mM	NaCl
	20 mM	Tris-HCl
	10 mM	Glucose
	5 mM	Taurin
	2 mM	MgCl <sub>2</sub>

Die Substanzen wurden in aqua bidestillata gelöst. Für die Herstellung der einzelnen Gradienten wurden 20 %, 27 %, 33 %, 41 %, 50 % oder 60 % (w /v) Sucrose hinzugegeben. Mittels 1 M HCl wurde der pH-Wert auf 7.2 eingestellt. Die Lösungen wurden sterilfiltriert und bei +4 °C gelagert.

### 3.3.6. EPON Gebrauchslösung für die Elektronenmikroskopie

Für die EPON Gebrauchslösung wurden 2 Mischungen hergestellt:

Mischung A (weich):	93 g	EPON 812
	200 g	Eponhärter DDSA.
Mischung B (hart):	75 g	EPON 812
	66.5 g	Eponhärter MNA

Beide Mischungen sind flüssig. Sie wurden mindestens 30 min gerührt und haben dann eine Woche bei +4 °C lichtgeschützt geruht. Für die fertige Gebrauchslösung wurden Mischung A und B zu gleichen Anteilen gemischt, mit 4,5 ml Epon Beschleuniger DMP30 versetzt und für 10 min gerührt.

## 3.4. Zellkultur

### 3.4.1. Humane primäre RPE Zellen

#### 3.4.1.1 Präparation und Isolierung

Die Präparation der humanen Zellen erfolgte mit Spenderaugen Verstorbener, die nach der Einwilligung zur Hornhautspende und /oder zu der Spende zu Forschungszwecken in der Hornhautbank der Universitätsaugenklinik Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Verfügung standen.

Die modifizierte Zellisolierung und -kultivierung humaner primärer RPE Zellen basiert auf der Methode nach Engelman und Valtink (2004). Nach Entfernung von Iris und Linse wurde der Glaskörper vorsichtig entfernt und der Bulbusbecher zum Nervus opticus halbiert. Die neurosensorische Retina wurde mit einer chirurgischen Pinzette entfernt und in Kryoröhrchen überführt, um dann bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert zu werden. Anschließend wurden die Choroidea mit anliegendem RPE vorsichtig mit chirurgischer Schere und Pinzette gelöst (Abb. 2.1). Das Präparat eines Auges wurde in 2 ml PBS für 5 min gewaschen und dann in 2 ml einer Kollagenase-Lösung (Ia+IV, 1+1 Gemisch in Basalmedium F99, Gesamtkollagenase 1 mg/ml) für 2 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert; modifiziert nach Ventura et al. (1996). Anschließend wurde die Kollagenase enthaltende Zellsuspension mit 3 ml F99 + 10 % FCS versetzt, womit die Enzymreaktion gestoppt wurde. Danach wurde das Häutchen vorsichtig geschwenkt, um lose anhaftende RPE Zellen abzulösen. Anschließend wurde das restliche Gewebe in 2 ml Medium F99 + 1 % FCS überführt und für 4 Tage bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert, um konditioniertes Medium zu gewinnen (siehe 3.2.2). Die RPE Zellsuspension wurde abzentrifugiert (RT,  $100 \times g$ , 5 min). Das Pellet wurde in 4 ml  $\text{F99}_{\text{RPE}}$  sine ChCM resuspendiert. Um möglichst homogene Zellkulturen in Zellanzahl (dichte konfluente Monolayer) und Morphologie (keine Zellkonglomerate) zu erhalten wurden die Zellen vor der Aussaat durch ein  $70\text{ }\mu\text{m}$  Zellsieb passiert. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass es sich bei den so gewonnenen Zellen, um braun-schwarz pigmentierte vereinzelte RPE Zellen handelte. Präparationen mit Anteilen von nichtpigmentierten Zellen (z.B. Fibroblasten) oder rotbräunlich pigmentierten Melanozyten wurden nur selten beobachtet und dann verworfen.

Mit den bis dato zur Verfügung stehenden Techniken konnte keine Kontrolle über den Erhalt und/ oder den Status zellspezifischer Charakteristika in vitro durchgeführt werden. Die gewählten Zellkulturbedingungen können aber eine erhebliche Rolle spielen in Bezug auf die Art der durchgeführten Studie (Feng, et al. 2003, Ham, et al. 1979, von Recum, et al. 1999). Die Vergleichbarkeit mit anderen Studien in der Literatur ist limitiert, solange keine einheitlichen Zellkulturbedingungen evaluiert und definiert wurden. Studien, wie die von Hu und Bok (2001), Pfeffer (1990) und Miceli und Newsome (1996), stellen einen Anfang dar. In Bezug auf die Erforschung der Phagozytose im Allgemeinen und am RPE im Speziellen wurde in dieser Arbeit erstmals der Zusammenhang mit Zellkulturmedienbedingungen hergestellt.

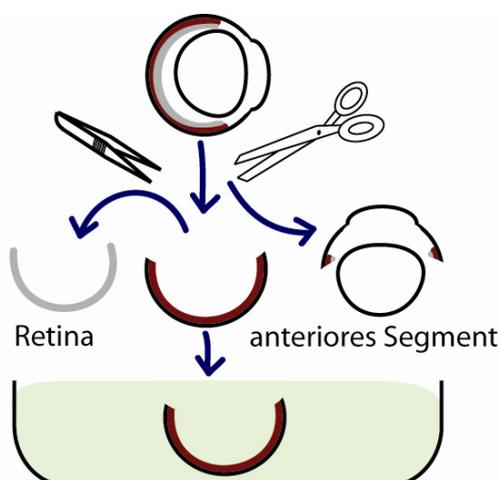


Abb.2.1: Präparation der Augen: Das anteriore Segment bestehend aus Kornea, korneoskleralem Ring, Iris und Linse wird entfernt durch einen kreisförmigen Schnitt im Bereich der Ora serrata. Im Anschluss wird die Retina nach Durchtrennung des Sehnervs entnommen. Die apikale Seite des retinalen Pigmentepithels liegt nun frei zugänglich für die enzymatische Behandlung.

### 3.4.1.2 Zellkultur

Nach 24 h Inkubation wurde das Medium mit den nicht adhärenen Zellen mit einer Pipette aufgenommen. Diese wurden auf vier neue mit Gelatine beschichtete Zellkulturplattenlöcher überführt und es wurden je 0,5 ml frisches F99<sub>RPE sine ChCM</sub> hinzugegeben. Dreimal wöchentlich wurde ein Medienwechsel vorgenommen, nicht adhären Zellen wurden entfernt. Sobald die Primärkultur konfluent war, wurde sie für Versuche eingesetzt. Dazu wurden die Zellen erst durch ein Zellsieb passiert, um möglichst dissoziierte Einzelzellen zu erhalten. Danach wurden diese in einer hohen Aussaatdichte ausgesät, um frühzeitig Konfluenz zu erhalten. Die Zellen wurden dafür zu 12.000 Zellen in 50 µl Medium pro Zellkulturschalenloch in eine mit Gelatine beschichtete 96-Loch Kulturplatte (0.316 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Die Kulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach etwa 24 h wurden vorsichtig weitere 50 µl Medium hinzupipettiert. Danach wurde ein Medienwechsel (50 µl pro Loch) dreimal pro Woche durchgeführt. Nach 6 - 9 Tagen wiesen die Zellkulturen Konfluenz auf und wurden für die Untersuchungen eingesetzt (Abb. 2.2).

Die Zellkulturen humaner retinaler Pigmentepithelzellen zeigten lichtmikroskopisch für diesen Zelltyp *in vitro* charakteristische morphologische Merkmale. Die Zellen waren unterschiedlich stark pigmentiert, epitheloid bis hexagonal, wiesen verschiedene Zellgrößen auf und wuchsen im Monolayer. Zellkerne und Zellgrenzen waren gut abgrenzbar. Bereits bei der Proliferation der Zellen in Primärkultur war ein Verlust des Pigmentgehaltes zu beobachten. Ziel war es, die Zellen möglichst früh nach der Isolierung zu untersuchen. Weiterhin sollten folgende Bedingungen gewährleistet sein: möglichst homogene Zellkulturen in Zellanzahl (dichte konfluente Monolayer) und Morphologie (keine Zellkonglomerate).

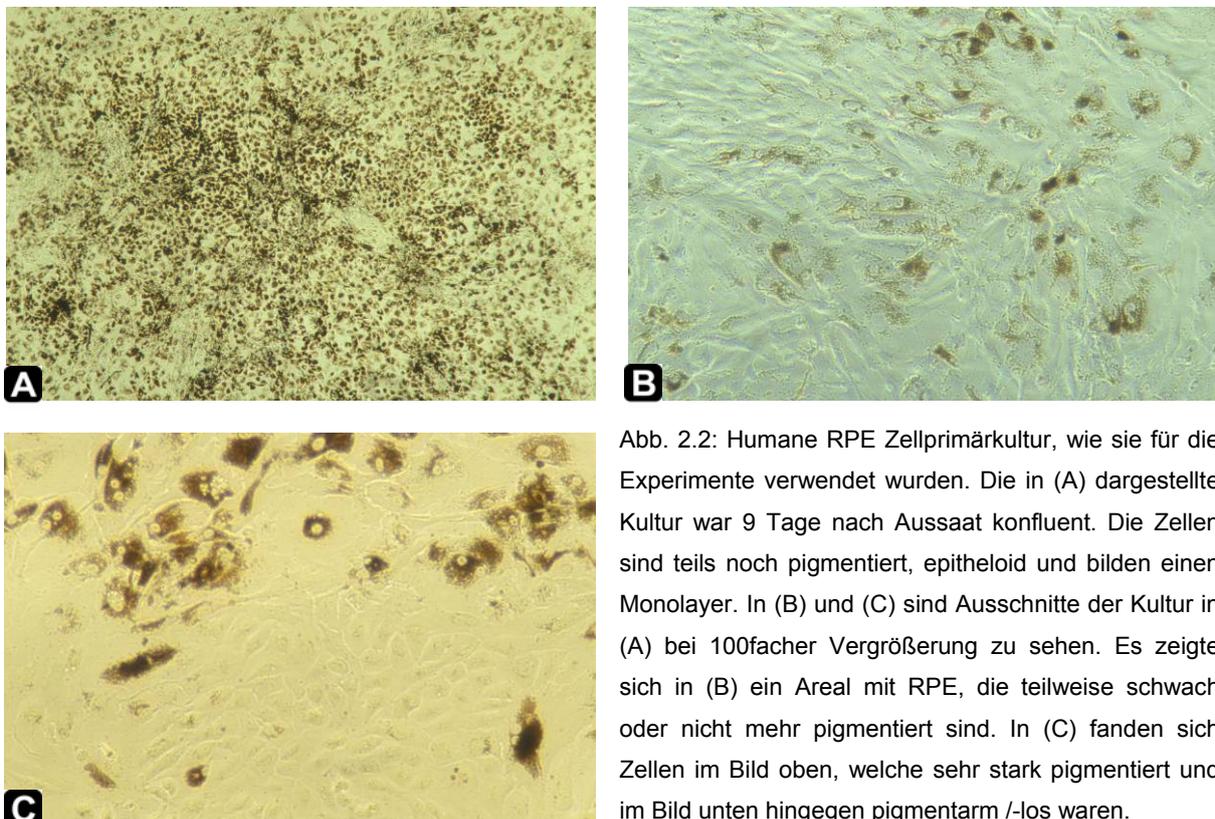


Abb. 2.2: Humane RPE Zellprimärkultur, wie sie für die Experimente verwendet wurden. Die in (A) dargestellte Kultur war 9 Tage nach Aussaat konfluent. Die Zellen sind teils noch pigmentiert, epitheloid und bilden einen Monolayer. In (B) und (C) sind Ausschnitte der Kultur in (A) bei 100facher Vergrößerung zu sehen. Es zeigte sich in (B) ein Areal mit RPE, die teilweise schwach oder nicht mehr pigmentiert sind. In (C) fanden sich Zellen im Bild oben, welche sehr stark pigmentiert und im Bild unten hingegen pigmentarm /-los waren.

### 3.4.2. Humane permanente RPE Zellen

Eine in der Hornhautbank der Augenklinik des UKE etablierte (Abb. 2.3), mit dem Simian Virus 40 (SV40) transfizierte (nicht-transformiert, permanent) RPE Zelllinie (SV40-RPE), wurde in die Untersuchungen mit einbezogen (Bednarz, et al. 2000, Schellhorn, et al. 1999). Das verwendete Plasmid (pSVtsA58) enthält die genetische Information der large T- and small t-Antigene des SV40 sowie einen temperatursensitiven Promoter (Aktivierungs- 33°C, Deaktivierungstemperatur 37 °C). Die SV40-RPE Zellen wiesen ein verstärktes Proliferationsverhalten in vitro auf; v.a. unter permissiver Inkubationstemperatur von 33°C. Morphologisch stellten die Zellen sich größenhomogen dar, wiesen kein Pigment mehr auf und zeigten einen elongierten Phänotyp in Subkonfluenz und polygonale Morphologie in Konfluenz (Abb. 2.3).

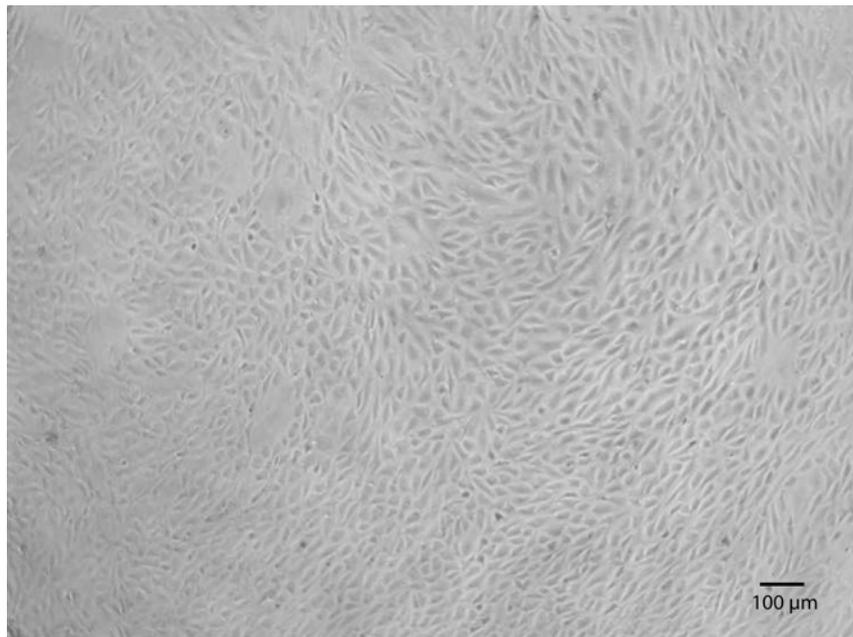


Abb. 2.3: Konfluente humane SV40-RPE Zellen zeigen eine polygonale Morphologie in vitro.

Die in dieser Arbeit verwendete nicht-transformierte permanente Zelllinie 309/97 GVO stammte von einer RPE Zelle einer 35 Jahre alten Spenderin. Die SV40-RPE Zellen befanden sich für die Experimente in der 5. bis 10. Passage (etwa 20 bis 30 Populationsverdopplungen) entspricht. Zeichen der Seneszenz traten erst nach 40 CPD auf (Schellhorn et al., 1999).

#### 3.4.2.1 Zellkryokonservierung und -subkultivierung

Die Zellkulturen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen zur Proliferation bei 33 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Medium F99<sub>RPE sine ChCM</sub> inkubiert. Vor Konfluenz der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-frei gespült und für 30 s mit Trypsinlösung (0.05 % Trypsin /0.02 % EDTA in PBS Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>-frei) überdeckt. Dann wurde die enzymatische Lösung bis auf einen dünnen Film abgesaugt und die Zellen für maximal 5 min bei RT inkubiert. Abgelöste Zellen wurden in 10 ml F99 + 5 % FCS aufgenommen und bei 100 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Subkultivierung auf 4 neue gelatinebeschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Phagozytoseexperimente wurden die Zellen in F99<sub>RPE sine ChCM</sub> aufgenommen und in einer Dichte von 10.000 Zellen/ Loch in eine 96-Loch Zellkulturplatte ausgesät, die zuvor mit Gelatine beschichtet wurde. Nach 3 - 5 Tagen wiesen die Kulturen eine Konfluenz von etwa 80 % auf und wurden

für die Phagozytoseexperimente verwendet. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 1 ml FCS + 10 % DMSO in ein 2 ml Kryovial pipettiert und in einem Einfriergefäß (Nalgene™) zunächst mit einer Rate von  $-1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$  auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Reaktivierung der Zellen wurden sie rasch aufgetaut und mit F99 + 5 % FCS einmal gewaschen, anschließend im Medium F99<sub>RPE</sub> sine ChCM aufgenommen und auf gelantinebeschichtete 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät.

### 3.4.3. RPE Zellen der RCS- und Kontroll Ratte

#### 3.4.3.1 Tierstämme und Tierhaltung

Für einige Untersuchungen wurde das RPE von BDE-Ratten (Black hooded Duckrey-E3 rats; Hedrich, 1990) als Kontrolle und von RCS- Ratten (Royal College of Surgeons rats; Bourne et al., 1939) als Tiermodell für eine vererbte Netzhautdegeneration isoliert und kultiviert. Die Tiere wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß (derzeit UKBF, Berlin; z.Z. UKE Hamburg) zur Verfügung gestellt. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des UKBF bei 55 % Luftfeuchtigkeit, einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten. Ad libitum wurde Haltungsfutter für Ratten und Wasser zur Verfügung gestellt. Im Alter von 8-11 Tagen wurden die Tiere mit CO<sub>2</sub> getötet. Diese Methode entspricht den Euthanasieanforderungen für Versuchstiere (Laboratory Animals, 1996, 1997). Sofort nach Eintritt des Todes wurden die Augen der Tiere enukleiert.

#### 3.4.3.2 Zellpräparation und -isolierung

Die Zellkultur der Ratten-RPE Zellen wurde modifiziert nach der Methode von Edwards (1977) angelegt. Die Augen wurden nach Entnahme über Nacht in sterilfiltrierter Puck'scher Lösung (plus Gentamycin 50 µg /ml und Amphotericin 250 µg /ml; Puck et al, 1958) bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Zellverbände wurden durch Inkubation in 0,1 % Trypsin in Puck'scher Lösung (Ca<sup>2+</sup> /Mg<sup>2+</sup>-frei) bei 37 °C für 35 min voneinander gelöst. Die Augen wurden dann in Medium Ham's F10 (Ham, 1963) + 20 % FCS, + Gentamycin 50 µg /ml, + Amphotericin 250 µg /ml überführt, wodurch die Trypsinreaktion gestoppt wurde. Anschließend erfolgte die Präparation des RPE unter einem Binokularmikroskop: Die Augen wurden durch einen kreisförmigen Schnitt unterhalb der Ora serrata eröffnet und der vordere Abschnitt des Auges, sowie Glaskörper und neurosensorische Retina entfernt, so dass das RPE freilag. Mit Hilfe einer chirurgischen Pinzette wurde das RPE von der Bruch'schen Membran abgelöst und in Medium Ham's F10 überführt. Durch wiederholtes pipettieren wurden die Zellen vereinzelt und anschließend durch ein 70 µm Zellsieb gegeben. In der Neubauerkammer wurde dann die Zellzahl bestimmt. Man erhält circa 150.000 – 180.000 Zellen pro Bulbus.

#### 3.4.3.3 Zellkultivierung

Die Zellen wurden mit einer Aussaatdichte von 12.000 Zellen pro Loch und 50 µl Medium F99<sub>RPE</sub> sine ChCM in eine mit Gelatine beschichtete 96-Loch Kulturplatte ausgesät. Die Kulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach etwa 24 h wurden vorsichtig weitere 50 µl Medium hinzupipettiert. Medienwechsel (50 µl / Loch) wurden dreimal pro Woche durchgeführt. Nach 7 - 8 Tagen wiesen die Zellkulturen eine Konfluenz von etwa 80 - 90 % auf und wurden für die Untersuchungen eingesetzt. Die Kultivierung der Ratten-RPE Zellen war unter den gleichen Bedingungen wie

der humane RPE Zellen möglich. Die kultivierten RPE Zellen der RCS- und Kontrollratten wiesen lichtmikroskopisch eine polygonale Gestalt auf.

### 3.5. Immunhistochemische Färbungen

#### 3.5.1. Gewebeschnitte

##### 3.5.1.1 Gewebefixierung und -bearbeitung

Humane Bulbi von Spendern wurden aus dem Rechtsmedizinischen Institut der Universität Hamburg erhalten. Diese wurden in der histologischen Abteilung der Augenklinik der Universität Hamburg in neutralgepufferten 0%igen Formalin für 3 Tage fixiert. Innerhalb von 12 h wurden die Bulbi in den Einbettautomaten eingebracht, wo sie in aufsteigender Ethanolreihe (80%, 96% und 100%) sowie Trichlormethan dehydriert, geklärt und mit flüssigem Paraffin (60 °C) zu Blöcken eingebettet wurden. Am Rotationsmikrotom wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die mindestens 1 Stunde bei 60 °C getrocknet wurden. Die Paraffinschnitte wurden mir von der histologischen Abteilung der Augenklinik Hamburg zur Verfügung gestellt.

##### 3.5.1.2 Gewebevorbereitung für die Färbung

Zur vollständigen Entfernung des Einbettmediums wurden die Schnitte in einem ersten Xylolbad gespült und in einem zweiten für 30 min entparaffiniert. Der Vorgang des Rehydrierens umfasste eine Spülung und darauffolgende Inkubationen von jeweils 5 min in einer absteigenden Ethanolkonzentrationsreihe. Begonnen wurde mit absolutem Ethanol, dann 96 %igen und 80 %igen Ethanol. Ein 5 minütiges Bad in Aqua destillata beendete die Vorbereitung. Eine zu starke Fixation des Gewebes mit Formalin verursacht die Bildung übermäßiger Aldehydvernetzungen, die die Gewebsantigene maskieren und damit die Bindung von Primärantikörpern verhindern. Um dieses auszuschließen, wurden die Gewebeschnitte mit Proteinkinase K Lösung für 30 min bei RT vorbehandelt. Anschließend erfolgte für 10 min eine Inkubation in PBS mit 5 % BSA, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

##### 3.5.1.3 Färbung nach der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode

Diese Technik basiert auf der Methode nach [Hsu et al.](#) (1981), die die starke Affinität von Streptavidin für Biotin (Dissoziationskonstante  $10^{-19}$ ) ausnutzt. Voraussetzung ist ein biotinylierter Zweitantikörper. Das mit der alkalischen Phosphatase markierte Streptavidin bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers. Ein Chromogen, hier Fuchsin, wird durch das Enzym umgesetzt und zeigt eine Rotfärbung (Abb. 2.4). Der Gewebeschnitt wurde für je 30 min erst mit dem Primärantikörper (1:20, 1:50, 1:100 in PBS mit 0,5 % Serum) und nach dreimaligem (à 3 min) PBS spülen dann mit dem Sekundärantikörper (1 µg /ml) inkubiert.

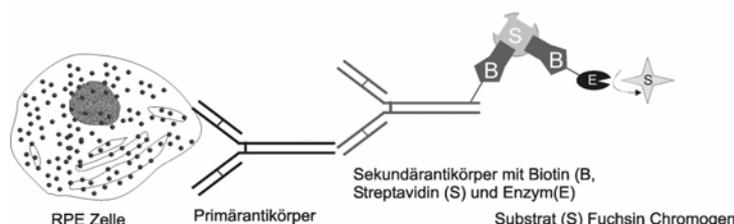


Abb. 2.4: Schema der Streptavidin-Biotin-Methode

Dann wurde für maximal 10 min mit dem Substrat Fuchsin inkubiert. Als Gegenfärbung diente Hämatoxylin, von welchem je ein Tropfen auf die Zellkultur gegeben wurde. Nach 1 minütiger Inkubation

wurde mit Aqua destillata gespült. Das Präparat wurde in Aquadex eingedeckelt. Alle Schritte wurden bei RT durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer, um eine Austrocknung des Präparates zu verhindern.

### 3.5.2. Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden in 96-Loch Kulturplatten angelegt. Bei Subkonfluenz wurden die Zellen mit kaltem PBS (w  $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$ ) dreimal gespült und anschließend mit 50 mM Glyzinpuffer pH 2.0 in 70 % Ethanol bei  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 min fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit kaltem PBS mit 1 % (v /v) FCS gespült und für 30 min mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten (à 3 min) wurde mit dem Sekundärantikörper für 30 min bei RT inkubiert. Die Zellkulturen wurden anschließend mit PBS überdeckt und Licht- oder Fluoreszenzphotographisch dokumentiert. Als primäre Antikörper wurden Immunglobuline vom Typ G aus der Ziege gegen humanes Mer (1:20, 1:50, 1:100) und gegen humanes Gas-6 (1:20, 1:50, 1:100) verwendet. Als Negativkontrolle wurde kein Primärantikörper hinzugegeben. Der verwendete sekundäre Antikörper (aus dem Kaninchen) reagierte mit IgG der Ziege (1  $\mu\text{g}$  /ml) und war mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

## 3.6. Prozessierung von Photorezeptoraußensegmenten

### 3.6.1. Isolierung von Photorezeptoraußensegmenten (OS)

Porcine retinale Photorezeptoraußensegmente (OS) wurden mittels Homogenisation, anschließender Dichtegradientenultrazentrifugation und abschließender Filtration isoliert. Es wurden Methoden aus der Literatur verwandt (Daemen 1973, Krebs, et al. 1977, McConnell 1965, Papermaster 1982) und modifiziert. Licht- und elektronenmikroskopische Kriterien dienten der Identifikation der erfolgreichen OS Isolation.

#### 3.6.1.1 Präparation der Retinae

Die Retinae wurden aus Schweineaugen, welche von der Großschlachtereier Böhms in Buxtehude bezogen wurden, entnommen. Die Bulbi wurden vom Muskelgewebe entfernt und in einer Betaisodonalösung in PBS 1:5 für max. 10 min desinfiziert und zweimal mit PBS gespült. Von nun an wurden alle folgenden Schritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Mit einem Skalpell wurde im korneoskleralen Übergang ein Schnitt gesetzt und von dort aus mit einer gebogenen Augenschere zirkulär unterhalb der Ora serrata umschnitten. Die Kornea mitsamt Ziliarkörper wurde verworfen. Die Retina wurde mit einer Pinzette unterhalb der Papille aufgenommen und mittels einer Schere abgetrennt. Pro Tag wurden etwa 100 bis 200 Retinae präpariert und bei  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$  maximal 5 Tage gelagert. Aus 500 oder 1000 gepoolten Retinae wurden dann die Photorezeptoraußensegmente (OS) isoliert. 100 Retinae entsprachen ungefähr 25 ml und wurden für einen Durchlauf des Isolierungsverfahrens verwendet. Die Retinae wurden langsam bei  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufgetaut.

#### 3.6.1.2 Homogenisation

Die Retinae wurden in einem Glashomogenisator (Fassungsvermögen 30 ml) behandelt. Auf diese Weise werden die Photorezeptoraußensegmente mechanisch am Innensegment des Photorezeptors abgetrennt. Eine Tablette Complete<sup>TM</sup> zur Proteaseinhibition wurde in 5 ml einer 20 %igen (w /v) Sucrosegradientenlösung gelöst und zu den Retinae hinzugegeben, um unspezifischen Proteinverdau zu limitieren. Je nach Homogenisator und Präparator sind unterschiedliche Anzahlen an Homogenisationszyklen (ein Zyklus entspricht einer Auf- und Abbewegung des Stempels im Homogenisator) be-

schrieben. In einem Vorversuch wurde mit je 3, 4, 5 und 6 langsamen Auf- und Abbewegungen des Homogenisatorstempels das Gewebe homogenisiert. Bei der hier verwendeten Technik stellte sich heraus, dass 5 Zyklen notwendig waren. Bei weniger Zyklen fanden sich vermehrt Akkumulate im OS Isolat, welche bei weiterer Filtration verloren gingen. Das führte zu einer geringeren OS Ausbeute pro Retina und starken Schwankungen im Verhältnis von Proteinmengen zu OS Anzahl (siehe Anhang 8.3.1; Tab.: Präparationsnummer 1 bis 5).

### 3.6.1.3 Dichtegradientenultrazentrifugation

In 6 Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman Polyallomer, 38.6 ml Fassungsvermögen) wurde ein Sucro-sedichtegradient, beginnend mit 20 % unterschichtet mit 27 %, 33 %, 41 %, 50 % und 60 % Sucro-segradientenlösung á 4 ml erstellt. Dazu wurde eine Spritze mit Gummikolben zur feineren, langsameren Dosierung verwendet. An die Spritze wurde ein auf 5 cm gekürzter Perfusorschlauch angeschlossen. Vom Homogenisat wurden vorsichtig 5ml auf den Gradienten pipettiert.

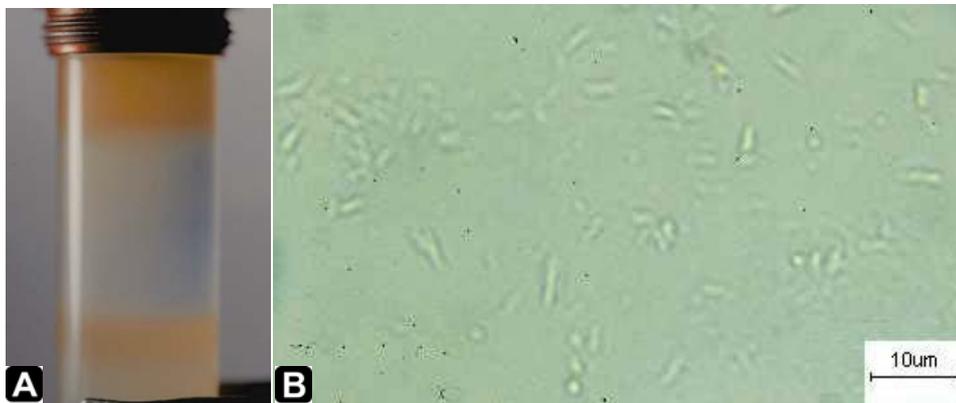


Abb.2.5: A) Sucro-sedichtegradient mit retinalem Homogenisat nach Ultrazentrifugation. In der obersten dunkel-orangefarbenen Bande finden sich lichtmikroskopisch die in Abbildung B) und elektronenmikroskopisch in Abbildung 2.6 dargestellten Photorezeptoraußensegmente.

In einer Beckman XL80 Ultrazentrifuge (Beckman für Rotor SW28) wurde für 1 Stunde und 10 min bei 28'000 rpm (141'371 g) zentrifugiert. Es wurde keine Bremsfunktion verwendet. Nach der Zentrifugation fand sich ein kräftiger orangefarbener Überstand (Abb. 2.6) von 5 -6 ml pro Zentrifugenröhrchen. Dieser wurde mittels Kunststoffpipette aufgenommen. Der gewonnene Überstand wurde durch sterile Schwarzbandfilter filtriert, um Akkumulate oder mögliche Verunreinigungen aus dem Grenzbereich der beiden obersten Gradienten zu entfernen.

### 3.6.1.4 Aufbewahrung der OS

Das Filtrat wurde 1:5 mit einem 0.02 M Tris-Puffer, pH 7.2 verdünnt und auf 8 sterile Zentrifugenröhrchen eines SA600 Rotors verteilt und in einer Sorvall Zentrifuge bei 13'000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet aus OS in 25 ml OS Einfrierlösung (siehe 3.2 Lösungen) resuspendiert. Portioniert á 1 ml in Kryovail wurden die Photorezeptoraußensegmentensuspensionen unter Verwendung eines Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container bei -80 °C gelagert.

### 3.6.2. Qualitätskontrolle der OS

#### 3.6.2.1 Licht- und Elektronenmikroskopie

Die gewonnenen OS wurden im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und bei 10'000 g in einer Minizentrifuge pelletiert und in 50 %iger Sucrosegradientenlösung resuspendiert. Durch Zugabe von 0.02 mM Tris-Puffer (pH 7.2) oder mehr Sucrosegradientenlösung ließ sich die Größe und Form der OS etwas variieren. Es wurde bei 1000 facher Vergrößerung mit Ölimmersion mikroskopiert. Lichtmikroskopisch zeigten sich bei entsprechender Aufbereitung vorwiegend intakte und vereinzelt Photorezeptoraußensegmente. Es konnten keine Unterschiede vor und nach einer Kryokonservierung beobachtet werden. Intakte OS sind sensitive Osmometer (Godchaux, et al. 1979, Korenbrot, et al. 1973). In hyperosmolarer Lösung ziehen sie sich zusammen und sind somit besser darstellbar. Es konnte beobachtet werden, dass bei sucrosefreien Lösungen die OS ihre ursprüngliche Form verloren und kugelig wurden. Teilweise waren die OS dann nicht mehr sichtbar. Eine Lagerung der OS bei -80°C in der verwendeten Photorezeptoreinfrierlösung nach Finnemann (1997a) zeigte lichtmikroskopisch keinen nachteiligen Einfluss auf die Photorezeptormorphologie.



Abb. 2.6: Elektronenmikroskopische Bilder einer Präparation von Photorezeptoraußensegmenten (OS). A) OS im horizontalen Anschnitt. Intakte OS mit eingeschlossenen Disks (rote kreisförmige Markierung) sowie OS Membranfragmente sind vorhanden. Es konnten keine anderen Zellbestandteile oder Organellen identifiziert werden.

Zur weiteren Validierung der isolierten OS wurden diese elektronenmikroskopisch untersucht. Die Untersuchungen wurden in den Laboren von Prof. Schäfer am Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf von mir durchgeführt. Die Gewebeaufbereitung erfolgte nach den Standardmethoden wie folgt. Die OS wurden in 1ml frisch angesetzter Lösung aus 2.5% Glutaraldehyd mit 0.1M Cacodylatpuffer (1:9, 4 °C und pH 7.3) für 2h fixiert. Dann wurde dreimal mit 1 ml 0.1 M Cacodylatpuffer mit 7.5 % Sucrose gespült. Zur Osmiumfärbung wurden 500 µl einer Lösung aus 2 % OsO<sub>4</sub> mit 0.1 M Cacodylatpuffer (1:1) im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1 h nachfixiert. Abermals wurde dreimal mit Puffer gespült und dann in mittels aufsteigender Ethanolreihe dehydriert. Die OS wurden in Propylenoxid zweimal für 15 min inkubiert. Am nächsten Tag wurden die OS mit EPON Gebrauchslösung eingebettet. Semidünnschnitte wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht. Ultradünnschnitte (40 nm) wurden mit einem Microtom (Leitz, Germany) hergestellt, auf ein Kupfernetz gegeben und mit Bleicitrat in 70 % Methanol kontrastiert. Die Schnitte wurden in absteigender Ethanolreihe rehydriert, luftgetrocknet und unter einem Elektronenmikroskop (Phillips, Germany) untersucht. Elektronenmikro-

skopisch fanden sich Partikel in der obersten Bande des Sucrosedichtegradienten mit der für Photorezeptoraußensegmente (OS) typischen Struktur. Das OS bestand weitgehend aus einer vertikalen Anordnung von dichtgepackten flachgedrückten Vesikeln, so genannten Disks. Die gesamte Struktur war umgeben von einer Plasmamembran.

### 3.6.2.2 Partikelzählung und Proteinbestimmung

Unter Verwendung eines Coulter Particle Count und Size Analyser Z2 (Beckman Coulter, USA) wurde die Anzahl und mittlere Größe der OS ermittelt (Tab.1). Dazu wurden 2, 3, 4 und 5 µl des Isolates in 20 ml frisch sterilfiltrierte Isoton II. Lösung (Becton Dickinson) gegeben. Der im Gerät integrierte Rührer wurde während den Messungen auf langsamer Geschwindigkeit verwendet. Es wurde eine Meßkapillare mit einer Öffnung von 50 µm verwendet. Das Meßvolumen wurde auf 100 µl eingestellt. Die unterste Grenze der noch gezählten Partikelgröße betrug 1,084 µm im Durchmesser. Nach oben wurde keine Größe festgelegt, da das Gerät eine Graphik zur Größenverteilung erstellt. Es wurde zur Leerwertermittlung die entsprechende Menge an reiner OS Einfrierlösung in 20 ml Isoton II. gegeben. Die Meßwerte wurden je fünfmal ermittelt und der Mittelwert berechnet. Als endgültige Größe wurde der Mittelwert aus den jeweiligen Verdünnungen berechnet. Aus Messungen an 14 Präparationen wurden ein Mittelwert von  $90,7 \times 10^6$  OS / Retina mit einer Standardabweichung von  $\pm 34,0 \times 10^6$  OS /Retina ermittelt. Nach der Methode von Bradford (1976) wurde die OS Proteinmenge bestimmt (Tab. im Anhang 8.3.1)

Zu 100 µl der Proteinlösung mit bis zu 100 µg Protein wurden 5 ml der Bradford Reagenz (siehe 3.2 Lösungen) gegeben und leicht geschwenkt. Nach 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 595nm gegen eine Referenz aus Aqua destillata gemessen. (Shimadzu, UV-200, Double Beam Spektrophotometer) Eine Eichgerade (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg) wurde mittels einer Lösung aus Rinderserumalbumin erstellt. Es ergaben sich im Mittel 63 µg Protein pro Retina mit einer Standardabweichung von  $\pm 17,75$  µg /Retina in 14 Präparationen mit 5 Homogenisationszyklen.

Zusammengefasst bedeutet das, dass man mit einer Retina somit theoretisch etwa 18 Löcher einer 96-Loch Kulturschale mit der für ein Phagozytoseexperiment ermittelten notwendigen Menge OS beschicken könnte. Bei der Vorbereitung der Experimente war jedoch ein erheblicher Verbrauch für die OS Zählung zu verzeichnen, welche vor jedem Experiment als Kontrolle erfolgte. Desweiteren war für die SNAFL<sup>®</sup>-2 Färbung eine größere Menge an OS aufzuwenden, als in den meisten Experimenten verbraucht werden konnte.

## 3.7. Messung der Phagozytose

### 3.7.1. Einführung

In den 60er Jahren wurden die ersten Untersuchungen zur Phagozytose des retinalen Pigmentepithelium (RPE) durchgeführt. Bis heute sind eine ganze Reihe an unterschiedlichen Methoden entwickelt worden, um diese zu beobachten und zu quantifizieren. Für die Durchführung dieser Arbeit sind bekannte Techniken aufgegriffen worden und in eine neue Zusammenstellung gebracht worden. Im Ergebnisteil wird dies unter 4.1 näher erläutert und im Diskussionsteil unter 5.1 erörtert. Die Phagozytose von RPE Zellen wurde in einem Zellkulturmodell untersucht. Isolierte fluoreszenzmarkierte Photorezeptoraußensegmente wurden mit RPE Zellen in vitro inkubiert. Eine Quantifizierung wurde mittels Zytofluorometrie sowie Durchflusszytometrie durchgeführt.

### 3.7.2. Fluoreszenzmarkierung der OS

#### 3.7.2.1 Einführung

In den ersten Experimenten zur Verfolgung der Phagozytose von OS in vivo wurden radioaktive Markierungen verwendet (Edwards 1991, Gregory, et al. 1991, Laird, et al. 1988, Philp, et al. 1988, Young 1967, 1971). Später erfolgten die ersten Studien mit in vitro kultivierten RPE Zellen, wobei eine Detektion der OS erst nach Inkubationsende durch Doppel- /Immunfluoreszenztechniken erzielt wurde (Boyle, et al. 1991, Chaitin, et al. 1983b, Finnemann, et al. 1997a, Hall 1978, Hall, et al. 1987, McLaren, et al. 1993). Erst in den 90er Jahren wurden FITC gekoppelte OS verwendet (McLaren, et al. 1993, Miceli, et al. 1994). Miceli und Newsome waren die ersten, die den Fluoreszenzfarbstoff 5-(und-6)-carboxy SNAFL<sup>®</sup>-2 (succinimidyl ester, mixed isomers)<sup>2</sup>, ein FITC Derivat verwendeten. Es handelt sich um einen fluoreszierenden pH Indikator mit einem Anregungsbereich im sichtbaren Licht. Dabei weist er zwei Emissions- und Exzitationsbereiche auf. Die protonierte Form (pH 6.0) ist stärker fluoreszent und wird selektiv zwischen 450 – 490 nm Wellenlänge angeregt mit einer Emission bei 530 nm. Die unprotonierte Form (pH 9.0) wird bei 568 nm angeregt mit einer Emission bei 650 nm. Mit Proteinen bildet sich eine sehr stabile Amidbindung, wobei der Farbstoff mit nichtprotonierten aliphatischen Amingruppen, inklusive dem Aminoterminus von Proteinen und der Aminogruppe von Lysinen reagiert (Whitaker, et al. 1991). SNAFL<sup>®</sup>-2 konjugierte Peptide wurden unter anderem dazu benutzt, um Rezeptorbindung und –internalisierung unter Verwendung eines Durchflusszytometer zu studieren (Fay, et al. 1994). Desweiteren wurde es zur Messung der Phagozytose von OS mittels Durchflusszytometrie eingeführt, wobei eine Messung der angebondenen OS bis dato nur durch manuelles Zählen im Lichtmikroskop möglich war (Miceli, et al. 1994).

#### 3.7.2.2 Versuchsdurchführung

Die entsprechende Menge OS wurden im Wasserbad bei 25 °C aufgetaut und bei 10'000 g in einer Minizentrifuge pelletiert. Für die Färbung von 1 mg Photorezeptoraußensegmenten wurden diese in 500 µl eines 100 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 8.0 mit 100mM Natriumchlorid) aufgenommen.

100 µg SNAFL<sup>®</sup>-2 wurden in 10 µl wasserfreiem Dimethylformamid gelöst. Beide Lösungen wurden zusammen gegeben und für 1 h im Dunkeln auf einem Schüttler (Eppendorf) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die OS dreimal mit dem Natrium-Phosphatpuffer gespült. Die nun als Pellet vorliegenden OS sind SNAFL<sup>®</sup>-2 markiert.  $5.0 \times 10^6$  OS pro 96er Loch beziehungsweise je 100 µl wurden für die Inkubation verwendet. Die markierten OS wurden binnen 24 h für Experimente verbraucht. Die SNAFL<sup>®</sup>-2 gefärbten OS zeigten im Zytofluorometer gemessen eine konzentrationsabhängige Fluoreszenz bei einer Extinktion (Ex) von  $485 \pm 10$ nm und einer Emission (Em) von  $580 \pm 25$ nm in Gegenwart von einem Puffer mit pH-Wert 6.0, welchem dem Zustand der phagozytierten OS entspricht (Abb. 2.8). In Gegenwart von einem Puffer mit pH-Wert 9.0, welcher in allen Experimenten Verwendung fand, um extrazellulär gebundene OS von phagozytierten unterscheiden zu können, ist nur eine geringfügige OS konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz zu verzeichnen. Die Fluoreszenz SNAFL<sup>®</sup>-2 markierter OS bei pH-Wert 9.0 kann nur mit einer anderen Filterkombination (Ex  $560 \pm 10$ nm, Em  $645 \pm 20$ nm) erfasst werden.

<sup>2</sup>SNAFL = Seminaphthofluoreszein; SNAFL<sup>®</sup>-2 = 5-(and-6)-carboxy, succinimidyl ester; C<sub>29</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>9</sub>, Mw: 557.90

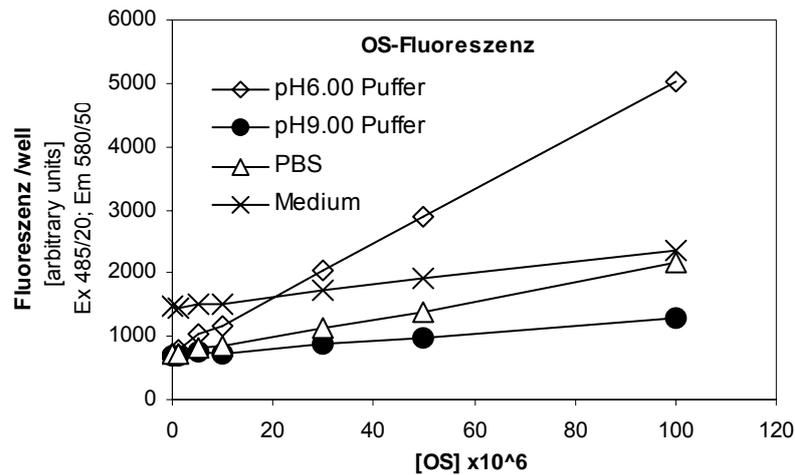


Abb. 2.7: Fluoreszenz SNAFL<sup>®</sup>-2 markierter OS in unterschiedlichen Lösungen.

### 3.7.3. Inkubation der Zellen mit OS

Für die unterschiedlichen Experimente wurden verschiedene Methoden gewählt, um die OS hinzuzugeben. So wurde in den Versuchen zum Einfluss von Basalmedien auf die Phagozytose die OS in einer Konzentration von  $5.0 \times 10^6$  OS / $\mu$ l in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$ -frei) mit einem Mikroliter pro 96er-Loch hinzupipettiert. In den Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Zellkulturmedienzusätze, sowie dem Einfluss verschiedener Pharmaka, wurden die Photorezeptoren im jeweils mit  $5.0 \times 10^6$  OS ( $\approx 1.5 \times 10^7$  OS / $\text{cm}^2$ ) in 50  $\mu$ l des verwendeten Basalmedium aufgenommen und ad 50  $\mu$ l auf die Zellen gegeben. Mit Basalmedium und Zusätzen wurden dann weitere 50  $\mu$ l pro 96er-Loch hinzupipettiert.

### 3.7.4. Zytofluorometer Technik

#### 3.7.4.1 Einführung

Das Zytofluorometer erlaubt die Intensitätsmessung mehrerer Fluorochrome unterschiedlicher Fluoreszenzbereiche in einer Zellkulturschale. Die mit SNAFL<sup>®</sup>-2 markierten Photorezeptoren emittieren im Licht im Grünbereich (Ex  $485 \pm 10$ nm; Em  $580 \pm 25$ nm), wenn sie als Phagolysosom (Lysosome weisen einen sauren pH Wert auf) im Zellinneren vorliegen (Miceli, et al. 1994).

Sind die Photorezeptoren jedoch noch außerhalb der Zelle an die Membran gebunden, so findet sich ein Licht im Orange- bis Gelbbereich (Ex  $560 \pm 10$ nm, Em  $645 \pm 20$ nm), wenn die Zellkultur mit einem Puffer von pH 9.0 überdeckt ist.

Die Intensitäten beider Fluoreszenzbereiche können in zwei aufeinander folgenden Schritten bei unterschiedlichen Filterkombinationen gemessen werden. Zusätzlich wurde in einem 3ten Schritt das im Blaubereich (Ex  $360 \pm 40$ nm, Em  $480 \pm 40$ nm) emittierte Licht der DAPI gefärbten Zellkerne ermittelt.

#### 3.7.4.2 Prinzip

Das für die Experimente verwendete Zytofluorometer mit Temperatursteuerung (CytoFluor<sup>™</sup> II, Applied Biosystems, USA) basiert auf einer Photoröhre in einer lichtgeschützten Messkammer. Diese wandelt ein sehr schwaches Lichtsignal (z.B. Zellfluoreszenz) in ein elektrisches Signal um und verstärkt es um mehrere Größenordnungen. Die Sensitivität liegt bei  $>8$  femtomol /Loch Fluoreszenz. Die Verwendung verschiedener Exzitations- und Emissionsfilter ermöglicht die Messung unterschiedlicher Fluoreszenzbereiche (Abb. 2.8).

### 3.7.4.3 Beschreibung des Messplatzes

Der Messplatz besteht aus dem Zytofluorometer selbst und einem angeschlossenen Computer. Die Computersoftware Cytofluor (Applied Biosystems, USA) wurde zur Steuerung des Gerätes und zur Datenerfassung verwendet. Der Messplatz befand sich in einem abgedunkelten Raum.

### 3.7.4.4 Versuchsdurchführung

Nach dem für das jeweilige Phagozytoseexperiment festgelegten Inkubationszeitraum wurde die 96-Loch Zellkultur aus dem Inkubator genommen. Die Zellen wurden zweimal mit 50  $\mu\text{l}$  PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  / $\text{Mg}^{2+}$ ) pro Loch gespült. Bei den transfizierten Zellen war größere Vorsicht geboten. Um nicht den Zelllayer mit dem Flüssigkeitsstrahl aus der verwendeten Multipipette (Eppendorf) zu beschädigen wurde gegen die Wandung des jeweiligen Zellkulturschalenloches pipettiert. Nun wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{l}$  einer 100  $\mu\text{M}$  4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) Lösung in deionisiertem Wasser für 5 min überdeckt. DAPI ist eine klassische Kern- und Chromosomgegenfärbung, welche spezifisch an doppelsträngige DNS bindet. In diesem Assay diente sie dazu, die gleichmäßige Anzahl an Zellen pro Zellkulturschalenloch in jedem Experiment zu überprüfen. Anschließend wurde abermals zweimal wie oben beschrieben gespült. Daraufhin wurde nochmal zweimal mit 50  $\mu\text{l}$  der pH 9.0 Überdeckungs-lösungen gespült und anschließend mit 10  $\mu\text{l}$  überdeckt. Die außen an der Zelle angehefteten OS emittierten nun orangegelbes Licht, die intrazellulären nach wie vor grünes (Abb. 2.8). Die Zellkulturschale wurde nun in den abgedunkelten Raum gebracht. Dort wurde sie ohne Zellkulturschalenabdeckung in den Zytofluorometer geladen. Die Zellen wurden 5 min vor jeder Messung in der Dunkelheit gelassen, damit eine zuverige Erregung durch Lichtexposition im Zellkulturlabor abklingen konnte. Dann wurde das Zytofluorometer über die Software am Computer gestartet und die Messung nach einem festgelegten Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden dazu dreimal mit den pH 6.0 Überdeckungs-lösungen gespült und mit 10  $\mu\text{l}$  überdeckt belassen. Am Lichtmikroskop stellten sich nun alle OS grün dar (Abb. 3.2). Nach 5 min in Dunkelheit wurde die zweite Messung nach dem gleichen Protokoll durchgeführt. Auf diese Weise ist eine Bestimmung der Gesamtmenge der im Assay befindlichen fluoreszenzmarkierten OS (angebundene und aufgenommene) möglich.

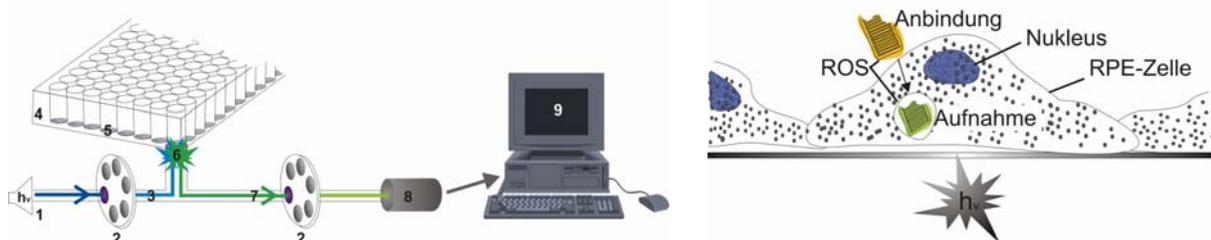


Abb. 2.8: (links) Prinzip des Zytofluorometers: (1=UV-Lampe, 2=Exzitationsfilter, 3=Exzitationslicht eines gewünschten Wellenlängenbereichs, 4=Zellkulturplatte mit 96-Loch, 5=konfluente Zellkultur, 6=Exzitation und Emission des Fluorchroms, 7=Emissionslicht vor dem Emissionsfilter, 8=Messung des gefilterten Emissionslichts durch einen Photomultiplier), 9=Computer mit Software zur Datenerfassung und Auswertung. (rechts) Schema der verwendeten Fluoreszenzmarkierungen im Phagozytoseassay: Die an die RPE Zellen angehefteten OS befinden sich in einer Pufferlösung mit einem pH von 9.0. SNAFL<sup>®</sup>-2 emittiert dabei ein orangegelbfarbenes Licht. Die phagozytierten und mit Lysosomen (pH 6.0) fusionierten OS emittieren ein grünliches Licht. Aufgrund der DAPI gefärbten doppelsträngigen DNS emittiert der Zellkern Licht im Blaubereich. ( $h\nu$  = Lichtquelle, ROS = rod outer segment = Photorezeptoraußensegment, Nukleus = Zellkern).

Im letzten Schritt wurden die Zellen lichtmikroskopisch angeschaut, um einen eventuellen Zellverlust oder die Verletzung des Zellmonolayers zu dokumentieren. Dann wurden die Daten auf grosse Ausreißerwerte durchgesehen und die entsprechende Zellkultur lichtmikroskopisch untersucht auf Photorezeptoraußensegment, Zellakkumulate oder sonstige Artefakte untersucht und ggf. dokumentiert.

### **3.7.4.5 Datenerfassung und Auswertung**

Jedes Zellkulturschalenloch wurde automatisiert im Zytofluorometer einzeln gemessen. Dazu wurde der erregende Lichtpuls zentral im Zellkulturschalenloch appliziert und die Emission gemessen. Eine Messung bestand aus 40 Lichtpulsen und der jeweiligen Emissionsmessung. Der Mittelwert wurde vom Computer errechnet und aufgezeichnet. Zum Großteil der Experimente wurden 8 Zellkulturlöcher für die Untersuchung eines Parameters verwendet. So wurden immer entsprechende Zellkulturen mit unmarkierten OS als Negativkontrolle bzw. zur Messung des Hintergrundsignals erfasst. Die Weiterbearbeitung der Daten erfolgte in Microsoft Excel. Der Mittelwert, der Median, die Standardabweichung und der SEM (Standardfehler des Mittelwertes) aller Messwerte eines Parameters wurden errechnet und dann die Negativkontrolle abgezogen. Zur Vereinfachung wurden die Ergebnisse zu einer jeweils entsprechenden Bezugsgröße prozentual dargestellt.

### **3.7.5. Durchflusszytometer Technik**

#### **3.7.5.1 Einführung**

Einige der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden anhand der Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt. Dadurch sollte die in dieser Arbeit entwickelte Methode der Zytofluorometrie verifiziert werden. Der Nachteil der FACS Methode ist die alleinige Messung der OS Aufnahme, da bei der Vorbereitung (Einzelzellsuspension) die an Zellen angebondenen OS verloren gehen. Ein Vorteil der FACS Methode ist die Einzelzellerfassung, wodurch man gegebenenfalls RPE Zellsubtypen mit unterschiedlicher Phagozytosekapazität identifizieren kann. Dieses ist wiederum in der Zytofluorometertechnik nicht möglich. Außerdem wurde die FACS Methode auch verwendet, um Messungen mit nur 1 h OS Inkubation zu studieren. Nach so kurzer OS Inkubation waren Einflüsse auf die Phagozytose im Zytofluorometer nicht signifikant detektierbar. Dazu wurden Zellkulturen nach Beendigung der Phagozytosemessung im Zytofluorometer der FACS Methode zugeführt.

#### **3.7.5.2 Prinzip des Durchflusszytometer**

Das Meßprinzip der Durchflusszytometrie ist die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel, wobei sie hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom untersucht werden. Es besteht vereinfacht dargestellt aus 3 Teilen: einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System und der Signalverarbeitung (Abb. 2.9). Das optische System besteht abermals aus 3 Teilen. Im Anregungsteil wird mit Hilfe unterschiedlicher Prismen ein Laserstrahl (Argonlaser mit einem Anregungsbereich in der 488nm Linie) so geformt, dass er eine bestimmte horizontal elliptische Form erhält. Diese stellt einen Kompromiss zwischen hoher räumlicher Auflösung und Signalintensität dar. Die beiden anderen Teile dienen der Signaldetektion des Streulichtes. Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität. Es spielen Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Struktur der Membran (Faltung) und intrazelluläre Bestandteile (Granula etc.) der Zelle eine Rolle. Es werden das stärkere Vorwärtstreulicht (axial zum anregenden Laserstrahl, 0-10°) und das Seitwärtstreulicht

orthogonal dazu,  $90^\circ$ ) detektiert, wobei aus letzterem die Fluoreszenz ermittelt wird. Das Vorwärtsstreulichtsignal gibt Auskunft über die relative Zellgröße. Ein hohes Signal spricht für große Zellen und ein geringes für „tote Zellen“. Das Seitwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Zellgranularität. Lichtsammeloptik, Strahlteiler und verschiedene Filter trennen Seitwärtsstreulicht von Fluoreszenzlicht und zerlegen dieses in verschiedene Farbbereiche. Photodetektoren wandeln die Laserlichtsignale in elektrische Pulse, die der Intensität des Lichtstrahls proportional sind, um.

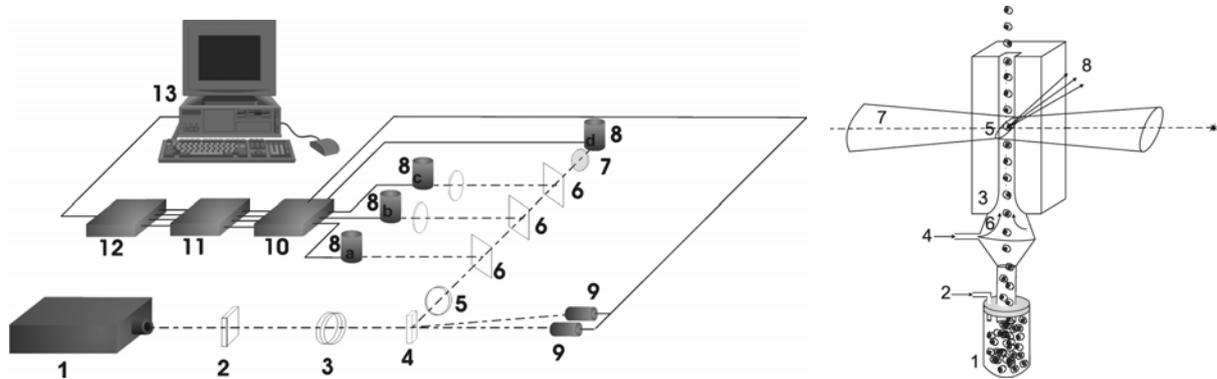


Abb. 2.9: Aufbau des Durchflusszytometers. (Linke Abbildung: 1=Laser, 2=Strahlerweiterung, 3=Fokussierlinse, 4=Messkammer = rechte Abbildung, 5 = Sammellinse, 6 =Teilerspiegel, 7 =Lichtfilter, 8 =Photomultiplier, 9 =Photodiode, 10=Vorverstärker, 11 =Impulsanalytoren, 12 =Analog-Digitalwandler, 13 =Datenverarbeitung) rechte Abbildung: Das Flüssigkeitssystem: Einzelzellsuspension von circa 0,5 bis 20 Millionen Zellen pro Milliliter im Reagenzröhrchen (1) wird durch Überdruck (2) in die aus Quarzglas bestehende Messküvette eingebracht, wobei eine parallel mit eingebrachte Trägerflüssigkeit (4) einen Hüllstrom bildet. Die Zellen passieren „im Gänsemarsch“ den Analysepunkt (5) in der Messkammer (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung = 6). Trifft der Laserstrahl (7) die Zellen im fokussierten Flüssigkeitsstrom, wird das Laserlicht gestreut (8).

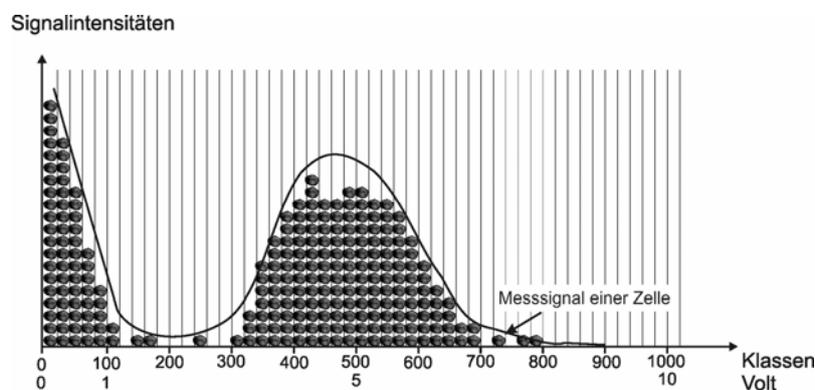


Abb. 2.10 (links): Einparameterhistogramm der Ereignisse: Angenommen, die Signalthöhe liegt irgendwo zwischen 0.00 und 10.24 Volt und das zur Messung benutzte Lineal hat eine Teilung von 0.01 Volt, so errechnet sich ein Bereich von 1024 Teilstufen / Intensitätsstufen.

Nach einer Signalverstärkung wird in Volt registrierte Signalintensität mittels Analog-Digitalwandler in eine Klassen- oder Kanalzahl konvertiert. Die Anzahl korreliert mit der Auflösungshöhe. Meist werden 1024 Kanäle aufgezeichnet (Abb. 2.10). Die Aufteilung der Ereignisse auf die Klassen erfolgt linear bei SSC und FSC wie in (Abb. 2.11) aufgezeigt. Bei der Messung von Immunfluoreszenz ist jedoch eine logarithmische Verstärkung zu wählen, da schwache Intensitäten auf diese Weise gespreizt und starke gestaucht werden (Schmitz, et al. 1994). Die in eine Klassenzahl konvertierte Lichtintensität wird für eine quantitative Analyse in einer Computerdatei aufgezeichnet.

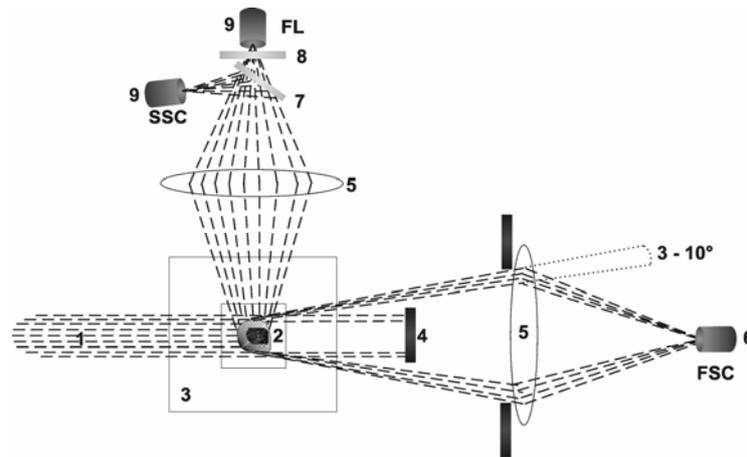


Abb. 2.11 (rechts): Anordnung der optischen Elemente eines Durchflusszytometers: Das Laserlicht (1) trifft auf die Zellen (2) in der Messkuvette (3). Das Vorwärtsstreuungslicht (FSC) wird durch Blockerstreifen (4) und Sammellinse (5) fokussiert und durch eine Photoröhre (6) in elektrische Signale umgewandelt. Das Seitwärtsstreuungslicht wird mittels Sammelloptik (5), Teilerspiegel (7) und Lichtfilter (8) in das Seitwärtsstreuungslicht (SSC) und die verschiedenen Farbereiche der Fluoreszenzen (9) zerlegt und mittels Photodioden detektiert.

### 3.7.5.3 Beschreibung des Messplatzes

Das verwendete Gerät, ein FACScan<sup>®</sup> (BD Bioscience), befand sich in den Einrichtungen der Knochenmarkstransplantation unter Leitung von Prof. Dr. B. Fehse der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin, Abteilung Onkologie und Hämatologie, Knochenmarkstransplantationslabor. Zur Datenverarbeitung war ein Apple Macintosh Computer angeschlossen. Das Computerprogramm CELLQuest (BD Bioscience) diente zur Akquisition, sowie zur Analyse der Daten.

### 3.7.5.4 Versuchsdurchführung

Das Gerät diente grundsätzlich zu Routineuntersuchungen im Rahmen des hämatologischen Labors und unterlag aus diesem Grund regelmäßigen internen Qualitätskontrollen. Weiterhin wurde die Fluoreszenzverstärkung täglich mit frisch verdünnten Calibrite<sup>™</sup>-Beads (BD Bioscience) standardisiert und kontrolliert. Nach der Durchführung eines Phagozytoseexperiments (Versuchprotokolle im Anhang 8.3) wurden die Zellen trypsiniert und dreimal in PBS gewaschen. Die Einzelzellpräparationen wurden in Zellfix (BD Bioscience) fixiert und bei +4 °C in Dunkelheit aufbewahrt. Eine FACS Messung wurde spätestens drei Tage nach dem Experiment durchgeführt. Für die Detektion der Fluoreszenz wurde eine Filterkombination im Grünbereich (Exzitation = 488 nm, Emission = 550 – 610 nm) ausgewählt. Als Negativkontrolle wurden Zellen verwendet, die ohne OS unter sonst gleichen Bedingungen behandelt wurden.

### 3.7.5.5 Datenerfassung und Auswertung

Beim Gating<sup>3</sup> wird eine Eingrenzung der erhobenen Daten durchgeführt. Dieses geschieht zu Beginn jeder Messung mittels der Datenakquisesoftware. Dabei ist es möglich per Augenmass eine Linie um den Bereich der interessierenden Zellpopulation zu ziehen. Die Umrahmungen in (Abb. 2.12 B) repräsentieren beispielhaft einen solchen Prozess. Für jede gemessene Zelle wurden drei unterschiedliche Parameter aufgezeichnet wurden: Größe (FSC), Granularität (SSC) und ein Fluoreszenzsignal (FL).

<sup>3</sup> gate (engl.) = engl. für Tor; Gating ist der Vorgang des Eingrenzens der Ereignisse; auch Messfenster genannt

Die Daten wurden mit CellQuest (BD Bioscience) auf einem Macintosh Computer in Form eines so genannten Zweiparameter-Punktehistogramm (kurz auch DOT-PLOT genannt) ausgewertet. Es wurden jeweils zwei der drei Messgrößen je Zelle in einem zweidimensionalen Koordinatensystem aufgetragen. In diese Matrix wurde dort ein Punkt eingezeichnet, an der sich die gemessenen Intensitätswerte der beiden Parameter (z.B. Fluoreszenzintensität und Vorwärtsstreulicht) einer Zelle schneiden.

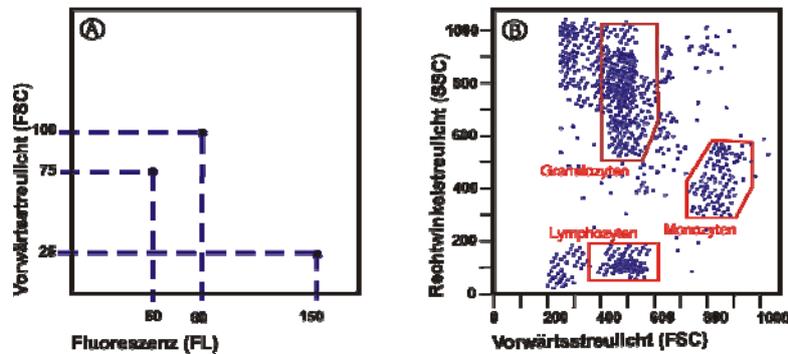


Abb. 2.12: DOT-PLOT Beispiel: A: theoretisches Diagramm: Korrelierte Darstellung von Vorwärtsstreulicht (FSC) und Fluoreszenz (FL); B: praktisches Diagramm: Durch die Korrelation von FSC und Seitwärtsstreulicht (SSC) lassen sich Zellsubpopulationen, wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifizieren. Das heißt, man erhält auch Informationen über die Zellheterogenität, denn jede Subpopulation weist ein eigenes Muster auf.

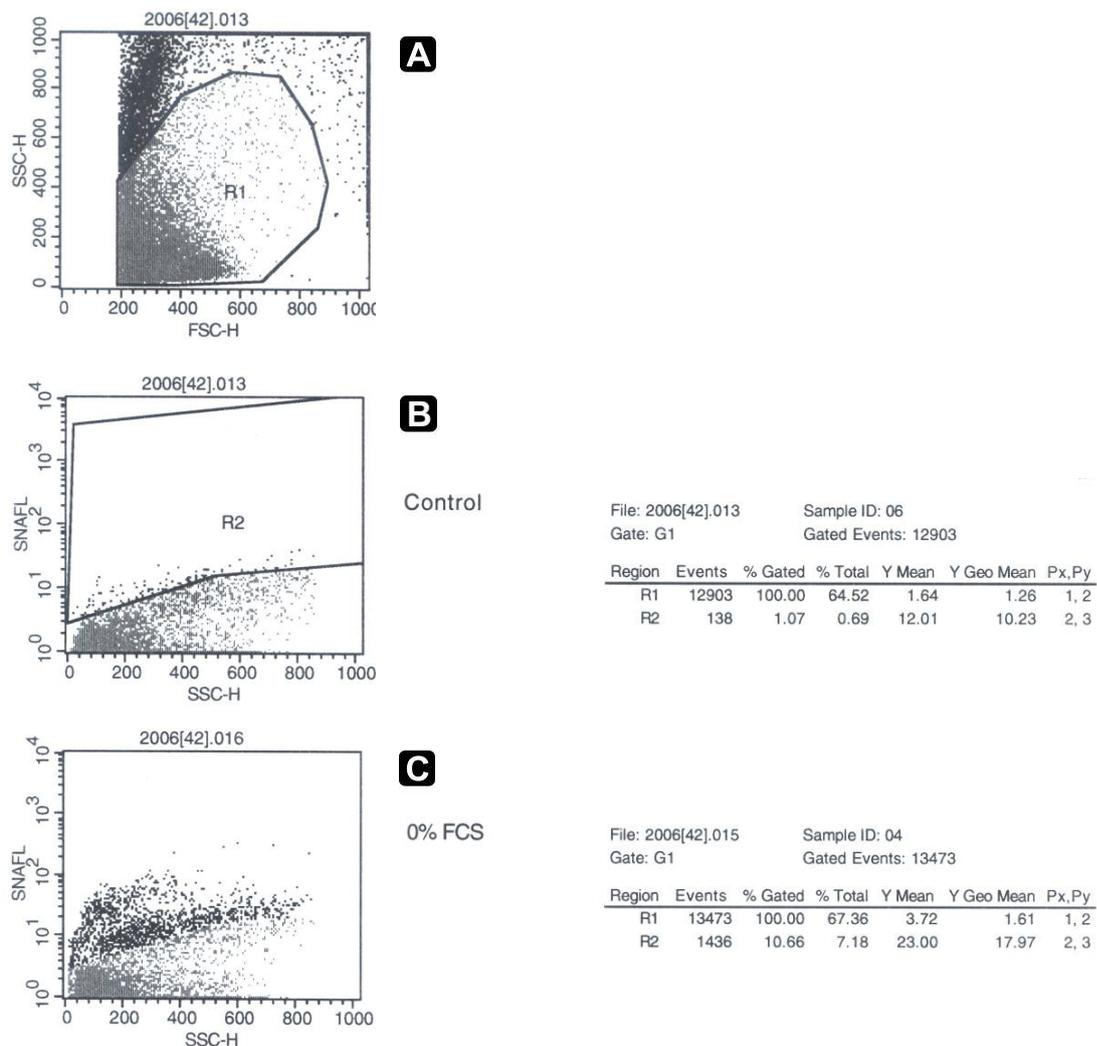


Abb. 2.13: FSC /SSC DOT-PLOT und Datenlegende: Beispiel einer Phagozytosemessung humaner RPE Zellen am Durchflusszytometer. Erläuterungen siehe im folgenden Text.

In der in (Abb. 2.13) ausgewählten Messung der Phagozytose des retinalen Pigmentepithels zeigen nur noch die Messpunkte nach Anwendung des Gatings. Alle Datenpunkte ausserhalb des Gates sind schon nicht mehr dargestellt. Auf diese Weise werden nur die interessierenden Zellen weiter analysiert und so gegen Zelltrümmer, -aggregate, andere Zellen oder sonstige Partikel abgegrenzt.

Im ersten Schritt wurde mit dieser Technik im FSC /SSC DOT-PLOT die Hauptpopulation der RPE Zellen eingegrenzt (Abb. 2.13 A). Im zweiten Schritt wurde anhand der Negativkontrolle die Schwelle der Autofluoreszenz der RPE Zellen (welche unmarkierte OS phagozytiert haben) gegen die RPE Zellen (Abb. 2.13 B), welche fluoreszierende SNAFL<sup>®</sup>-2 markierte OS phagozytiert haben, abgegrenzt (Abb. 2.13 C). Das heißt alle Zellen, die oberhalb der letzthöchsten Klasse der Negativkontrolle liegen, werden als Positiv ausgewertet.

Die Software berechnete nun aus den so eingegrenzten Daten die in Abb. 2.13 B -C dargestellten Messgrößen. Die Region 1 (R1) entspricht den nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) ausgewählten RPE Zellen, welche der Messung dienen sollten. Die Region 2 (R2) definiert das Messfenster mit den autofluoreszenten RPE der Negativkontrolle an der unteren Grenze. Die geographic mean FL entspricht der mittleren Anzahl fluoreszierender OS pro Zelle per Region.

### 3.7.6. Datenauswertung und -darstellung

Die Versuchsansätze wurden auf 96-Loch Zellkulturplatten durchgeführt. Dabei waren maximal 10 verschiedene Testapplikationen (RPE plus Photorezeptoren und Testsubstanz), eine Negativkontrolle (RPE ohne Photorezeptoren) und eine Positivkontrolle (RPE mit Photorezeptoren) mit jeweils 8 Wiederholungen pro Platte möglich. Die Versuchreihe wurde jeweils mindestens dreimal in unabhängigen Ansätzen wiederholt. Somit beträgt zum Beispiel die Anzahl der ausgewerteten Zellkulturplattenlöcher bei 3 Wiederholungen  $n=24$ . War aufgrund von Zellverlust keine Auswertung eines Zellkulturplattenlochs möglich, wurde dieses ausgeschlossen. Die mittlere Autofluoreszenz wurde von den jeweiligen mittleren experimentellen Messwerten subtrahiert. Ebenfalls wurde der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Dies gilt sowohl für die Fluorometertechnik als auch für die FACScan Messungen. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte im Boxplotformat. Die Box repräsentiert 50 % der Daten, den Interquartilbereich. Der Median (schwarze dicke Linie), das 1. Quartil (unterer Fehlerindikator) und 4. Quartil (oberer Fehlerindikator) sind dargestellt. Folgende Symbole zeigen an: ○ Ausreißerwert (entsprechen Werten zwischen der 1.5 bis 3 fachen Größe des Interquartilbereich gemessen von dem oberen und unteren Boxende) und △ Extremwert (entspricht Werten, die größer als 3 Boxlängen von den Boxenden entfernt sind).

Alle Daten sind detailliert in Tabellen im Anhang 8.3 aufgeführt.

Die Signifikanzen wurden aus den Rohwerten aller Messungen mit der Software ANOVA (SPSS Inc., USA) errechnet. Dazu wurde der Tukey HSD Subtest zur Multivarianzanalyse verwendet, für welchen immer eine Normalverteilung der Daten vorliegen sollte. Die Signifikanz wurde angenommen, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % vorlag ( $p < 0,05$ ). Die entsprechenden Daten wurden in Tabellen im Ergebnisteil bzw. Anhang 8.3 aufgeführt sowie auch durch folgende Zeichen in den Graphiken dargestellt: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$  und \*\*\*  $p < 0,0001$  ( $p$  = Probability, Signifikanz).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Methode der Phagozytosemessung

#### 4.1.1. Zytofluorometrie-technik

**D**er mit dieser Arbeit etablierte Assay zur Messung der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch retinale Pigmentepithelzellen stellt eine neue Modifikation der bisher beschriebenen Methoden dar. Die gestellten Anforderungen an den Assay wurden wie folgt erarbeitet. Die OS wurden mittels dem Fluoreszenzfarbstoff SNAFL<sup>®</sup>-2 (Miceli, et al. 1994) kovalent markiert. Diese Fluoreszenzverbindung wurde aufgrund unterschiedlicher Emissionsspektren in Abhängigkeit des pH-Wertes gewählt. Nach der Markierung der OS wurden diese stark fluoreszent (Abb. 3.2). In der aziden Form (entspricht OS in pH 6.0 Lösung oder intralysosomal) erschienen die OS hell grün. Bei Applikation eines Puffers mit dem pH-Wert von circa 9.0 erschienen die markierten OS blass gelb-orange. Auf diese Weise konnten die aufgenommenen von den angehenden OS unterschieden werden (Abb. 3.2). Die Erfassung aller im System befindlichen OS (Total-OS) konnte durch Zugabe eines extrazellulären Puffers mit pH 6.0 erfolgen.

Bei SV40-RPE stellte sich im Verlauf der Arbeit heraus, dass diese sich nach unterschiedlicher Zeit nach Zugabe des Puffers sich abzulösen begannen. Vergleichbares konnte an Primärkulturen von RPE Zellen (Human und Ratte) nicht beobachtet werden, so dass dort die Bestimmung der Total-OS möglich war.

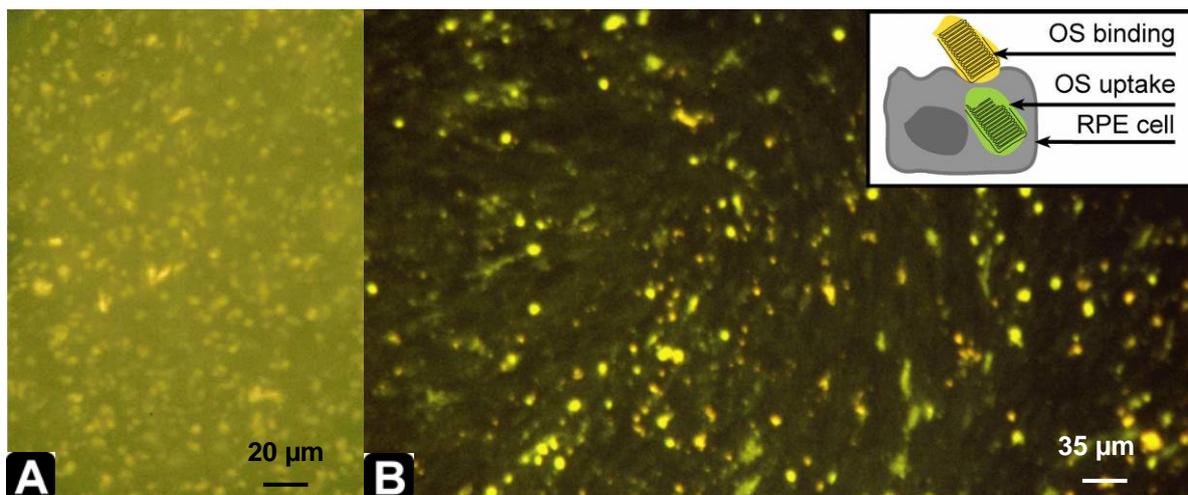


Abb. 3.2: Demonstration von OS Anbindung und OS Aufnahme SNAFL<sup>®</sup>-2 markierter Photorezeptoraußensegmentpartikel (OS) durch humane SV40 transfizierte retinale Pigmentepithelzellen (RPE). A) Fluoreszenzphotographie markierter OS in einem Puffer mit pH 5.5. Die Exzitation beträgt  $485 \pm 10\text{nm}$  und die Emission  $580 \pm 25\text{nm}$  (Miceli, et al. 1994). B) Fluoreszenzaufnahme von OS, wenn sie in Phagolysosomen im Zellinneren vorliegen fluoreszieren sie gelb-grünlich. Die außen an den Zellen angehängten OS fluoreszieren orange-rötlich (Ex  $560 \pm 10\text{nm}$ , Em  $645 \pm 20\text{nm}$ ).

Trotz gleichmäßiger Aussaatdichte des primären humanen RPE wurden Abweichungen der Zellzahlen pro Kulturschalenloch nach Konfluenz beobachtet. Daher wurden Zellkernfärbungen mit DAPI durchgeführt und die Ergebnisse dadurch normalisiert. Im Falle der SV40-RPE waren die Abweichungen in der Zelldichte vernachlässigbar klein.

Tab. 3.1: Beispielmessung der Phagozytose im Zytofluorometer 4 Stunden nach OS Zugabe ( $5 \times 10^6$  OS pro Zellkulturschalenloch). SV40-RPE inkubiert mit ungefärbten OS dienten als Negativkontrolle, welche vom Messwert abgezogen wurde. ; OS+RPE = ungefärbte OS inkubiert mit SV40-RPE als Negativkontrolle; SNAFL-OS+RPE = SNAFL<sup>®</sup>-2 markierte OS inkubiert mit SV40-RPE; Total OS = angebundene + aufgenommene OS.

Zeit [h]	SNAFL-OS +RPE (Messwert)	OS+RPE (Leerwert)	(SNAFL-OS+RPE) minus (OS+RPE) (Messwert minus Leerwert)	Extinktion (EX) Emission (EM)	pH-Wert extrazellulär
4				EX485, EM580	
pH 9.0	1279,33	720,67	558,66	aufgenommene OS	pH 9.0
pH 6.0	1354,33	718,00	636,33	Total OS	pH 6.0
4				EX560, EM645	
pH 9.0	234,67	83,00	151,67	angebundene OS	pH 9.0
pH 6.0	108,00	83,00	25,00		pH 6.0

#### 4.1.2. OS Konkurrenztest

RPE Zellen weisen eine rezeptorvermittelte Phagozytose mit außergewöhnlicher Spezifität für OS auf (Finnemann, et al. 1997a, Mayerson, et al. 1986). Um den Phagozytoseassay an SV40 transfizierten humanen RPE zu verifizieren, wurde die Phagozytose von fluoreszenzmarkierten OS in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen nicht markierter OS untersucht. Nach 4 h wurde eine Abnahme des Fluoreszenzsignals in Gegenwart der konkurrierenden OS ermittelt. Dabei sank das Signal für die OS Anbindung bei Zugabe von  $2,5 \times 10^5$  OS, die der OS Aufnahme erst nach  $5,0 \times 10^5$  OS (Abb. 3.3)

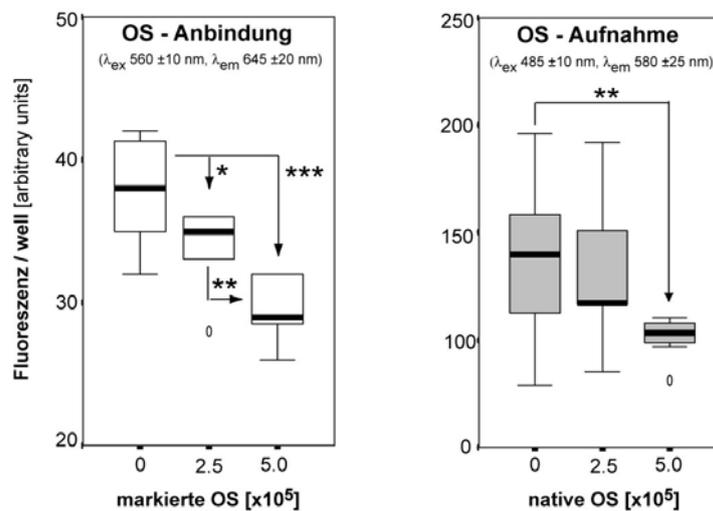


Abb. 3.3: Konkurrenzversuch der Phagozytose von fluoreszenzmarkierten ( $5 \times 10^6$ ) und nativen ( $2,5$  und  $5,0 \times 10^5$ ) OS gemessen nach 4 h Koinkubation (Daten einer 8fach Bestimmung).

## 4.2. Charakterisierung der SV40-RPE Phagozytose

### 4.2.1. Einfluss der OS Menge

In einem ersten Versuchsansatz wurden die notwendigen Photorezeptoraußensegmentmengen (OS) für die Untersuchung der SV40-RPE Phagozytose bestimmt. Dazu wurden humane SV40 transfizierte RPE Zellen mit verschiedenen OS Konzentrationen inkubiert. Nach 4 h wurden die angebundene und aufgenommene OS im Zytofluorometer bestimmt. Aufgrund des hohen Verbrauchs von OS wurden diese Versuche mit 5 parallelen Ansätzen nur einmal durchgeführt (Abb. 3.4).

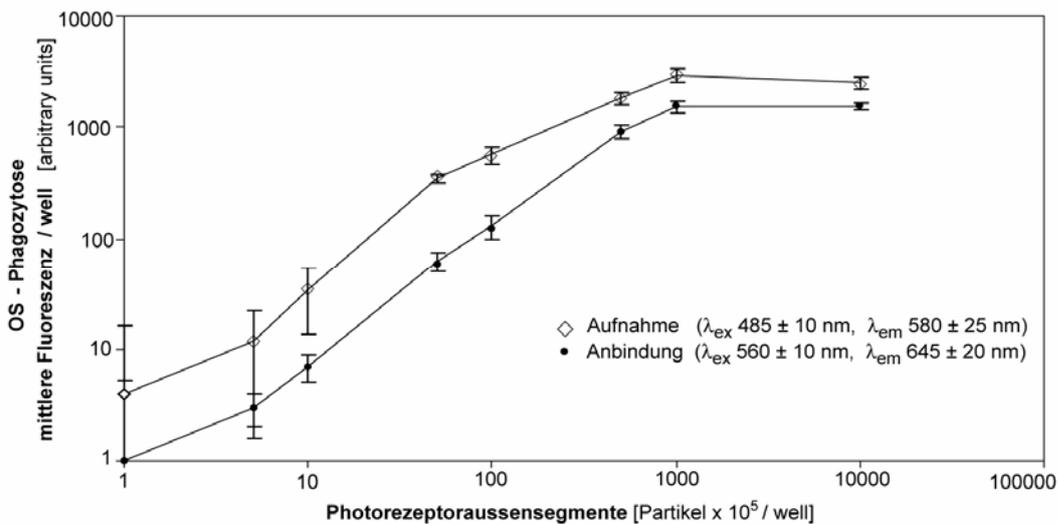


Abb. 3.4: SV40-RPE Phagozytose in Abhängigkeit der Konzentration von Photorezeptoraußensegmenten (OS) nach 4h. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert abzüglich des Leerwerts (RPE inkubiert mit nativen OS)  $\pm$ Standardabweichung (SD) aus 5 parallelen Ansätzen eines Experiments bei extrazellulärem pH-Wert von 9.0.

Dabei war ein zunehmender Anstieg von Anbindung ( $\bullet$ ) und Aufnahme ( $\diamond$ ) zu beobachten. Eine Sättigung trat ab einer OS Konzentration von circa  $0,5$  bis  $1,5 \times 10^8$  pro 96-Loch auf (Abb. 3.4). Das entspricht einer OS Konzentration von ( $\sim 1,4$  to  $4,2 \times 10^7$  OS /  $\text{cm}^2$ ). Bis zu einer OS Konzentration von  $10^6$  wiesen die Messwerte eine hohe Standardabweichung auf. Bei der Isolation von Photorezeptoren aus Schweinen wurden im Mittel  $6 \times 10^7$  OS pro Retina gewonnen (siehe Tab. im Anhang 8.3.1).

Daher wurde eine OS Konzentration gewählt, wobei auf der einen Seite ein hohes Signal mit geringer Standardabweichung und auf der anderen Seite ein ökonomischer Aufwand der OS Präparation berücksichtigt wurde. Für die weiterfolgenden Untersuchungen wurden daher  $5 \times 10^6$  OS pro 96er Zellkulturschalenloch verwendet, so dass aus 1 Retina etwa 5 Löcher beschickt werden konnten.

#### 4.2.2. Phagozytosekinetik

SV40-RPE wurde mit  $0,5 \times 10^7$  OS in  $100 \mu\text{l}$  Medium F99 plus 5 % FCS pro Zellkulturschalenlöcher inkubiert und der Zeitverlauf der OS Phagozytose über 24 h studiert. Wenn die OS auf die Zellen gegeben werden, können die ersten angebotenen OS nach ungefähr 15 min beobachtet werden. Nach 30 min waren circa 50 % der maximalen Anbindung erreicht und mit einer weitaus langsameren Steigerung trat nach 2 h eine Sättigung ein (Abb. 3.5).

Über den zeitlichen Verlauf bis zum Messwert nach 24 h war noch eine weitere geringfügige Zunahme der Anbindung zu verzeichnen. Eine Aufnahme war nach 30 min zu verzeichnen, sie stieg nach 1 h auf  $\sim 20$  % und nach 4 h auf  $\sim 50$  % des Sättigungswertes. Im Verlauf betrachtet war die Größte, im Wesentlichen lineare Zunahme der OS Aufnahme in den ersten 6 h zu beobachten. Danach war für 2 - 3 h (Zeitpunkt 6 - 10 h) keine weitere Zunahme messen. Zwischen Zeitpunkt 10 und 16 h stieg die OS Aufnahme weiter an ( $p < 0,001$ ) und erreichte nach etwa 12 h eine Sättigung.

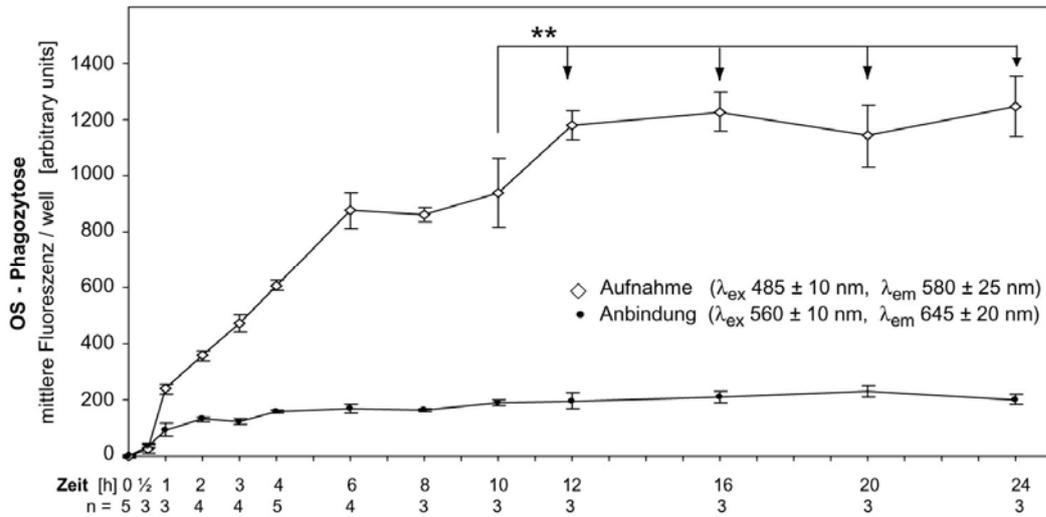


Abb. 3.5: Zeitverlauf der OS Phagozytose von humanen SV40-RPE Zellen über 24 h. Datenpunkte = Mittelwert  $\pm$ SD aus n Experimenten. Anzahl der Experimente (n), bestehend aus 8 Wiederholungen für jeden Zeitpunkt.

### 4.2.3. Serumeinfluss

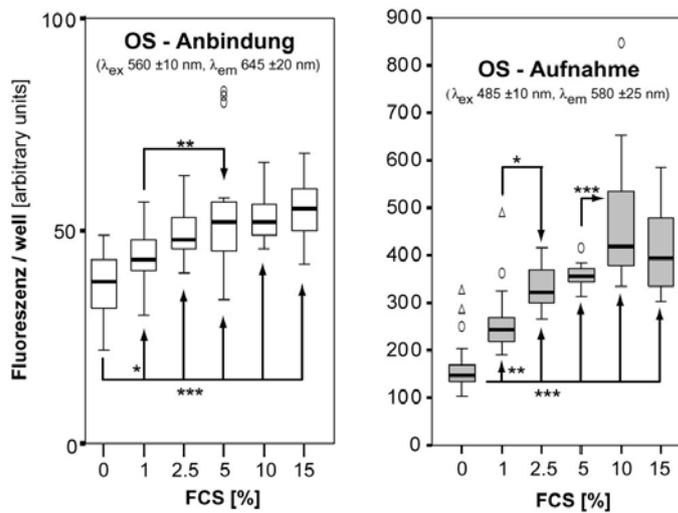


Abb. 3.6: Serumzugabe steigert die OS Phagozytose von SV40-RPE Zellen (n=3 x 8 Wiederholungen).

Die für RPE Zellen beschriebene spezifische Steigerung der Phagozytoseaktivität durch Serum wurde an den SV40 transfizierten humanen RPE Zellen überprüft. Eine signifikante Zunahme der OS Aufnahme in Abhängigkeit der Serumkonzentration konnte auch bei SV40-RPE-Zellen beobachtet werden. Dabei variierte die konzentrationsabhängige Steigerung der Aufnahme 1,7 bis 3fach je nach Serumkonzentration (1 bis 15 % FCS). Ein Maximalwert des FCS Effekts wurde bei Zugabe von 10 % beobachtet ( $p < 0.0001$ ). Eine weitere Steigerung unter 15 % FCS fand nicht statt. Die Anbindung nahm geringfügig bis auf das 1,5fache im Vergleich zur serumfreien Referenz zu. Dabei war eine Sättigung ab 2,5 % FCS ( $p < 0.0001$ ) zu bemerken (Abb. 3.6, alle Messwerte und Statistikdaten sind ausführlich gelistet in Tabellen im Anhang 8.3).

### 4.3. Phagozytose und Tissue Engineering

#### 4.3.1. Serumfreie Medien

Der Einfluss von in der Literatur gängigen Basalmedien für die RPE Zellkultivierung wurde in Bezug auf die OS Phagozytose untersucht. Die Vorinkubation der SV40-RPE Zellkulturen mit den Testmedien wurde für 12 h durchgeführt, in welcher die SV40-RPE Zellkulturen keinen lichtmikroskopisch sichtbaren Veränderungen unterworfen waren. Als Testmedien wurden verwendet: MEM(E), DMEM, F99 (1:1 Mischung der Medien Hams's F12 und Medium 199), SFM (kommerzielles serumfreies Medium) und hSFM (SFM speziell für Humanzellen entwickelt).

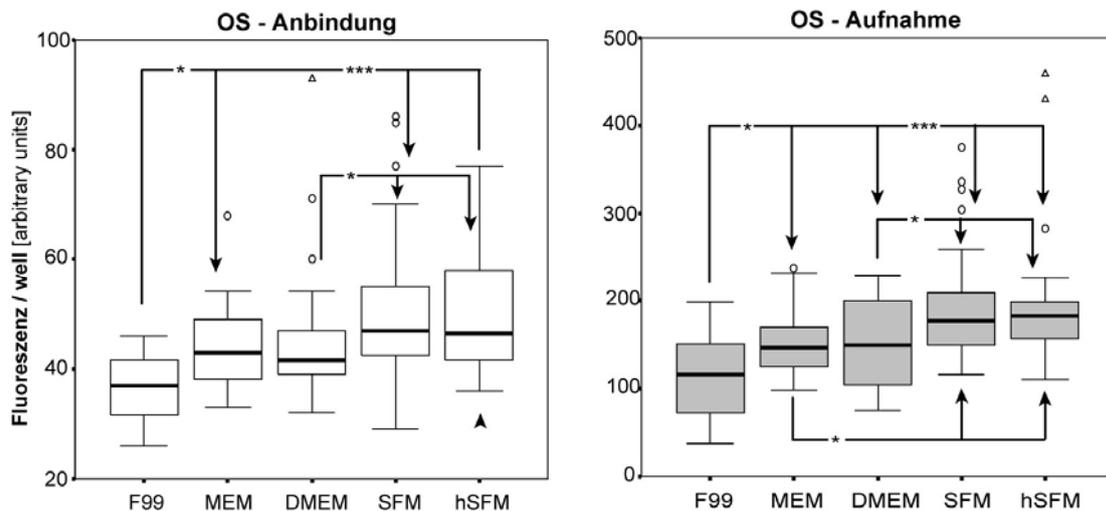


Abb. 3.7: Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch SV40-RPE Zellen in Abhängigkeit der Vorinkubationen (12 h) in verschiedenen Basalmedien (n=4). Die Auftragung der Daten ist im Boxplotformat. Die Box repräsentiert 50% der Daten, den Interquartilbereich. Der Median (schwarze dicke Linie), das 1.Quartil (unterer Fehlerindikator) und 4.Quartil (oberer Fehlerindikator) sind dargestellt. (Symbole: ○ Ausreiserwert, △ Extremwert, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.00001$ )

Die Inkubation in diesen unsupplementierten Zellkulturmedien beeinflusste die Phagozytose der OS durch SV40-RPE wie folgt signifikant. Das Zellkulturmedium F99 wurde als Referenzgröße gewählt, so dass Anbindung (AB) und Aufnahme (AF) zu 100% gesetzt wurden. Die Phagozytoserate in Medium MEM(E) und DMEM war vergleichsweise erhöht ( $p < 0.05$ ). In MEM(E) ergab die Phagozytosemessung  $133 \pm 4$  % AF und  $117 \pm 3$  % AB beziehungsweise in DMEM  $136 \pm 6$  % AF und  $114 \pm 3$  % AB. Eine signifikant noch höhere Phagozytoserate im Vergleich zu F99 war nach Inkubation in SFM ( $154 \pm 4$  % AF,  $p$   $130 \pm 4$  % AB;  $p < 0.00001$ ) und hSFM ( $159 \pm 4$  % AF,  $139 \pm 4$  % AB;  $p < 0.00001$ ) zu beobachten. Die Unterschiede der Anbindung und Aufnahme der OS Phagozytose unter Inkubation mit SFM und hSFM waren auch signifikant höher im Vergleich zu MEM(E) und DMEM ( $p < 0.05$ ; Abb. 3.7).

#### 4.3.2. Serumsupplementierte Medien

Des Weiteren wurden die Medien mit dem geringsten (F99) und mit dem größten Effekt (SFM) auf die Phagozytose von RPE Zellen weiter charakterisiert. Dabei wurde die Phagozytose in diesen Medien unter Serumsupplementierung (FCS) verglichen. Unter diesen Bedingungen wurde eine weitere Differenz beider Medien evident (Abb. 3.8)

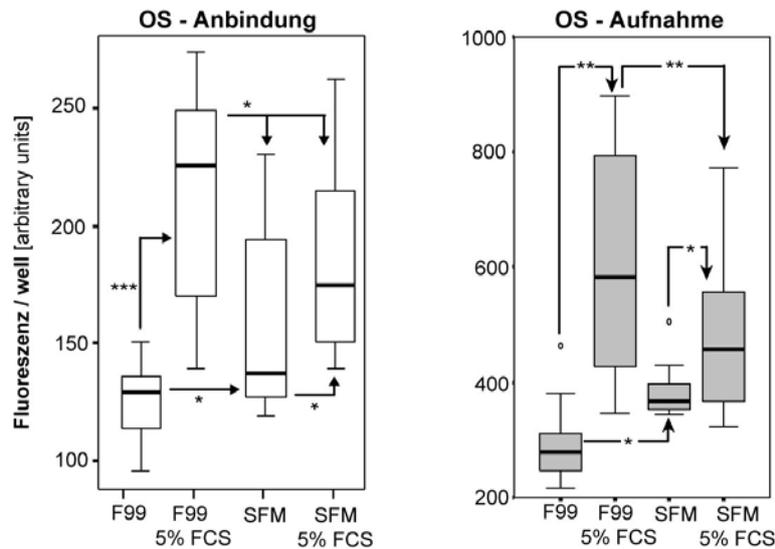


Abb. 3.9: Phagozytose von OS durch SV40-RPE Zellen in Basalmedium F99 und SFM  $\pm$  5 % FCS (n=3).

Unter 5% FCS Supplementierung stieg die OS Aufnahme auf  $217 \pm 7$  % in F99 im Vergleich zum serumfreien F99. Im Gegensatz dazu führte 5 % FCS supplementiertes SFM Medium zu einer geringeren Änderung der OS Aufnahme ( $170 \pm 5$  %). In den nachfolgenden Experimenten wurde das Medium F99 aus folgenden Gründen weiterverwendet. Zum einen war die Serumstimulation im Vergleich zu SFM ausgeprägter mit 5 % FCS und zum anderen erwies sich F99 in Bestimmungen der RPE Proliferationsraten (noch nicht veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Engelmann) gegenüber MEM, DMEM und den SFM Medien weitaus überlegen.

#### 4.3.3. Choroidea konditioniertes Medium

CHOROIDEA KONDITIONIERTES MEDIUM (ChCM) in serumfreiem Medium F99 führte zu einer statistisch signifikanten, konzentrationsabhängigen Senkung der phagozytischen OS Anbindung und Aufnahme (Abb. 3.10).

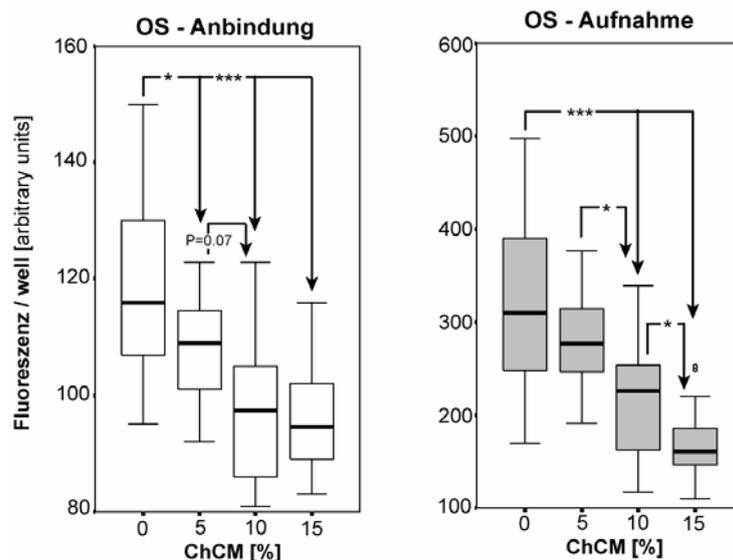


Abb. 3.10: Zytofluorometrie: OS Phagozytose durch SV40-RPE nach 12 h Vorinkubation in ChCM F99 (n=3).

ZYTOFLUOROMETRIEDATEN: Bei Zugabe von 5 % ChCM betrug die OS Aufnahme (AF)  $88 \pm 4$  % und Anbindung (AB)  $92 \pm 2$  % ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle (unsupplementiertes F99). Bei einer

Konzentration von 10 % ChCM fiel die Phagozytoseaktivität weiter (AF  $67 \pm 6$  % SEM,  $p < 0.00001$ ; AB  $83 \pm 3$  % SEM,  $p < 0.00001$ ). Bei einer ChCM Konzentration von 15 % betrug die Phagozytose  $50 \pm 4$  % ( $p < 0.00001$ ) AF und  $81 \pm 2$  % AB ( $p < 0.00001$ ).

DURCHFLUSSZYTOMETERANALYSE: Die FACS Analyse der Phagozytose von SV40-RPE nach Vorinkubation in Choroidea konditioniertem Medium (Abb. 3.11), bestätigte die zytofluorometrisch gewonnenen Daten. Die Aufnahme sank auf 84 %, 73 % and 68 % unter den entsprechenden ChCM Konzentrationen 5 %, 10 % und 15 % im Vergleich zur Kontrolle (un-supplementiertes F99 Medium).

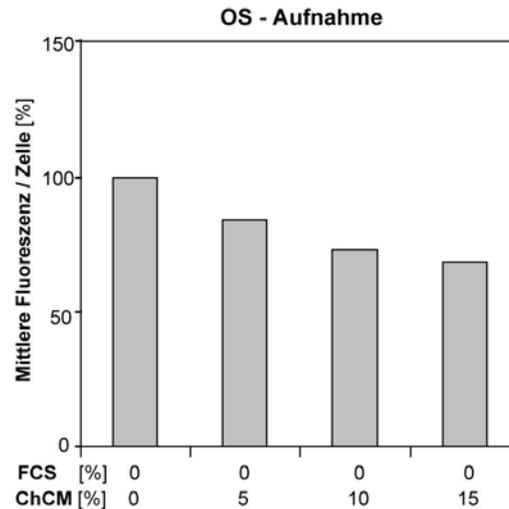


Abb. 3.11: FACS Analyse: Phagozytose von OS durch SV40-RPE nach 12 h Vorinkubation in Choroidea konditioniertem (ChCM) F99 Medium sowie F99 mit 5 % Serum (FCS) ( $n=1$ ; Daten einer Messung von  $>10'000$  Zellen aus 8 Repetitionen pro Variable).

#### 4.3.4. Retinaextrakt

RETINAEXTRAKT bewirkte bei niedriger Konzentration eine Steigerung und bei höheren Konzentrationen eine Senkung der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten durch SV40-RPE in serumfreien F99 Medium.

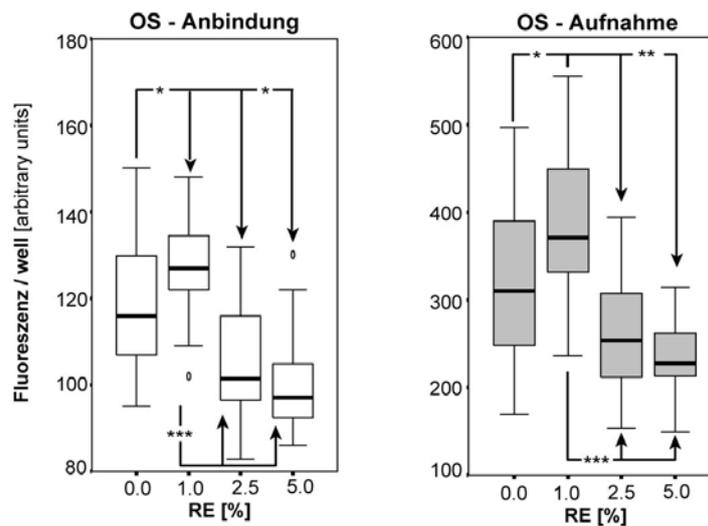


Abb. 3.12: Zytofluorometrie: Phagozytose nach 12 h Vorinkubation der Zellen in retinaextrakthaltigen F99 ( $n=3$ ).

Die Aufnahme und Anbindung von Photorezeptoraußensegmenten (OS) stieg auf  $122 \pm 5$  % SEM ( $p=0.01$ ) beziehungsweise  $108 \pm 2$  % SEM ( $p=0.01$ ) mit 1 % RE in Relation zur Kontrolle (zusatzfreies

F99) an. Höhere RE Konzentrationen bewirkte hingegen eine Abnahme der Phagozytose (OS Aufnahme) auf  $81 \pm 6$  % SEM ( $p=0.03$ ) bei 2,5 % RE und  $73 \pm$  % ( $p=.001$ ) bei 5,0 % RE (Abb. 3.12).

#### 4.3.5. Komplettmedien

Die im Hornhautlabor der Universitätsklinik Hamburg speziell für humane RPE Zellen entwickelten Zellkulturmedien mit Choroidea konditioniertem Medium (F99<sub>RPE</sub>) und ohne (F99<sub>RPE\_sine\_ChCM</sub>) sowie mit Retinaextrakt (F99<sub>RPE\_RE</sub>) wurden in ihrem Einfluss auf die Phagozytose charakterisiert.

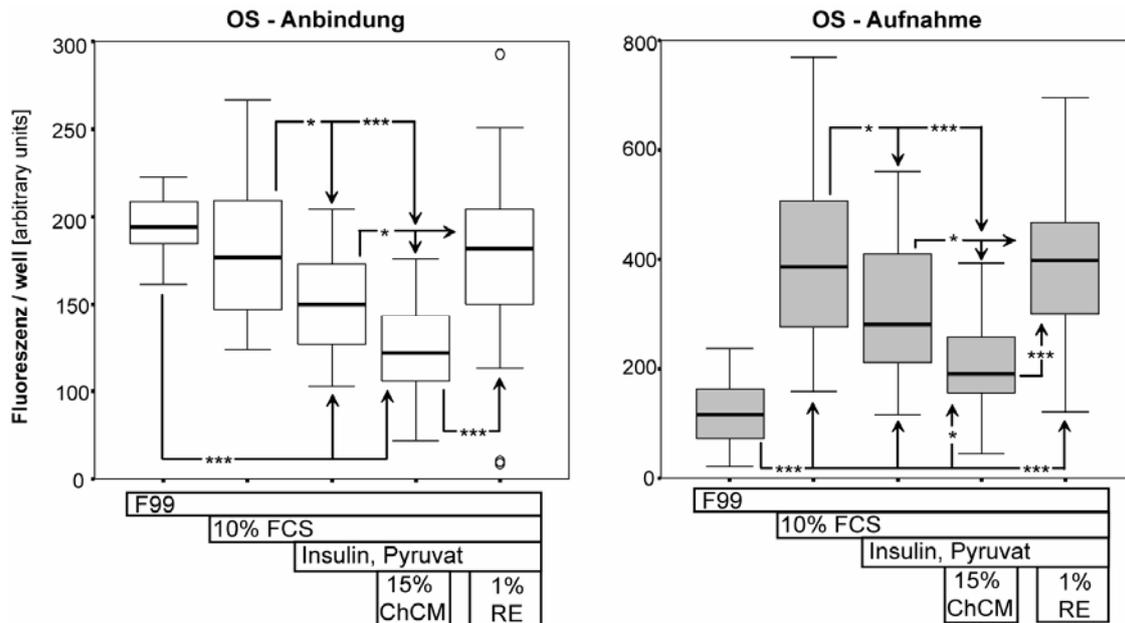


Abb. 3.13: Charakterisierung eines speziell für humane RPE-Zellen entwickelten Komplettmediums namens F99<sub>RPE</sub>. Dieses enthält Basalmedium F99, FCS, Insulin, Pyruvat und choroideakonditioniertes Medium (ChCM). Desweiteren gibt es noch die darauf basierenden Medien F99<sub>RPE\_sine\_ChCM</sub> ohne ChCM sowie F99<sub>RPE\_RE</sub> mit Retinaextrakt (RE) anstatt ChCM. Die Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch SV40-RPE Zellen nach 12 h Vorinkubation in den Testmedien wurde untersucht (n=4). (Symbole: ○ Ausreiserwert, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.00001$ ).

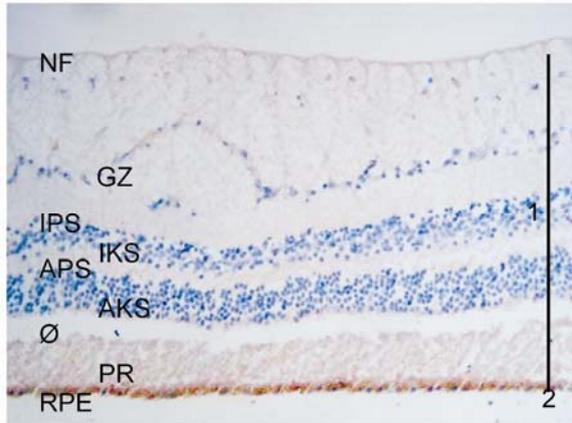
Das komplette Wachstumsmedium F99<sub>RPE</sub>, bestehend aus dem Basalmedium F99 supplementiert mit 10 % FCS, 1 µg /ml Insulin, 1 mM Pyruvat und 15 % ChCM, führte zu einer signifikant verringerten Phagozytoseaktivität im Vergleich zum Medium F99 mit 10 % FCS. Wurde das im Komplettmedium F99<sub>RPE</sub> vorhandene ChCM gegen 5% RE ausgetauscht, wurde kein Verlust an Phagozytoseaktivität im Vergleich zu F99 mit 10 % FCS beobachtet. Die Daten im Detail betrachtet ergeben folgendes (Abb. 3.13): Medium F99 ohne Supplementierung diente als Referenzgröße ( $100 \pm 9$  %). Bei einer Vorinkubation in Medium F99 mit 10 % FCS supplementiert erfolgte die schon zuvor beschriebene Steigerung der Phagozytose (AF  $326 \pm 7$  %). Die Zugabe von 1 µg /ml Insulin und 1 mM Natriumpyruvat (entspricht F99<sub>RPE\_sine\_ChCM</sub>) verringerte den FCS-Effekt signifikant auf  $257 \pm 7$  % AF ( $p < 0.00001$ ) und  $76 \pm 3$  % in AB ( $p < 0.00001$ ). Das Vervollständigen des Komplettmediums F99<sub>RPE</sub> mit 15 % ChCM reduzierte den FCS Effekt weiter auf  $172 \pm 8$  % in AF ( $p=0.001$ ) und  $64 \pm 4$  % in AB ( $p < 0.05$ ). Ersetzte man die ChCM Komponente durch 5 % RE (entspricht F99<sub>RPE\_RE</sub>) war kein Verlust der Phagozytoseaktivität zu beobachten. Im Gegenteil glich sogar die RE Supplementierung eine durch Insulin- und Pyruvatzugabe bedingte Verringerung der Phagozytoseaktivität aus. Die OS Aufnahme betrug unter F99<sub>RPE\_RE</sub>  $330 \pm 6$  % und die OS-Anbindung  $92 \pm 4$  % ( $p < 0.00001$ ).

## 4.4. Physiologie der RPE Phagozytose

### 4.4.1. Beteiligung von MerTK /Gas6

#### 4.4.1.1 Immunhistochemie

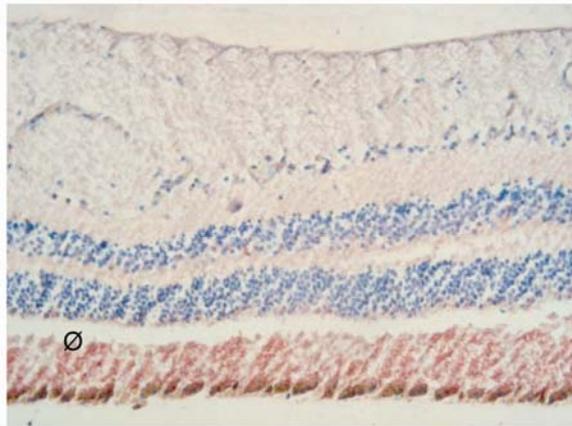
Kontrolle (63x)



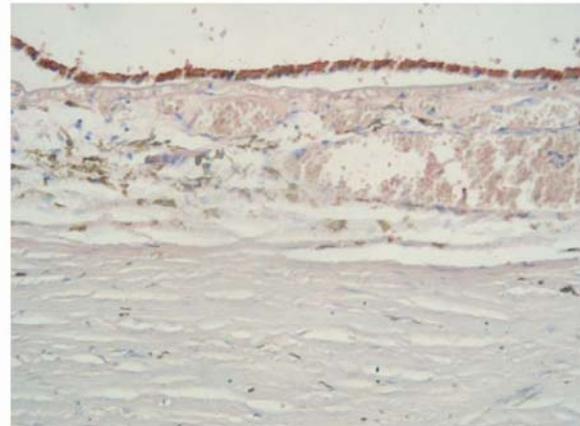
Kontrolle (100x)



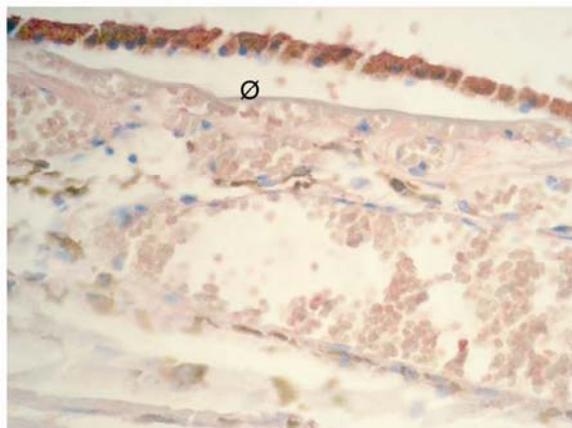
MerTK Ak 1:50 (63x)



MerTK Ak 1:50 (100x)



MerTK Ak 1:50 (200x)



MerTK Ak 1:50 (400x)

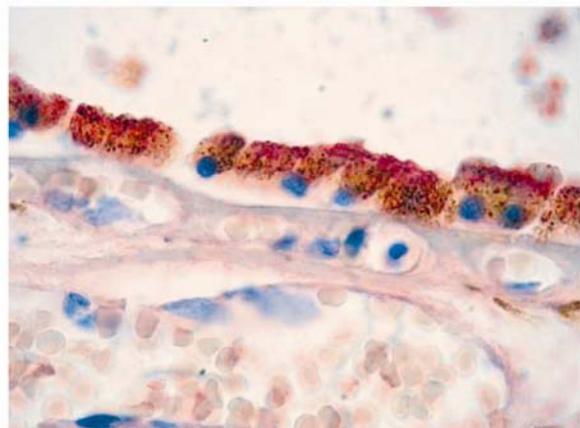
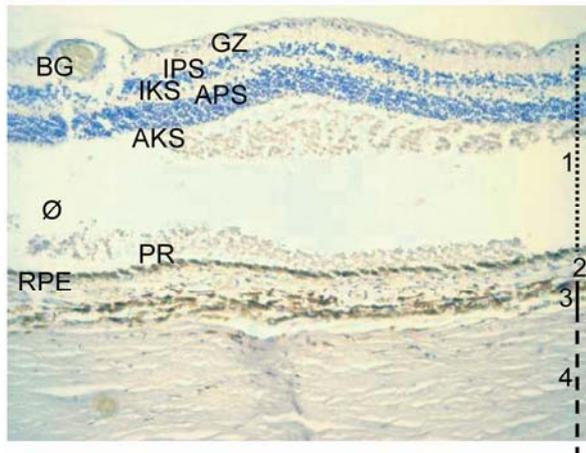
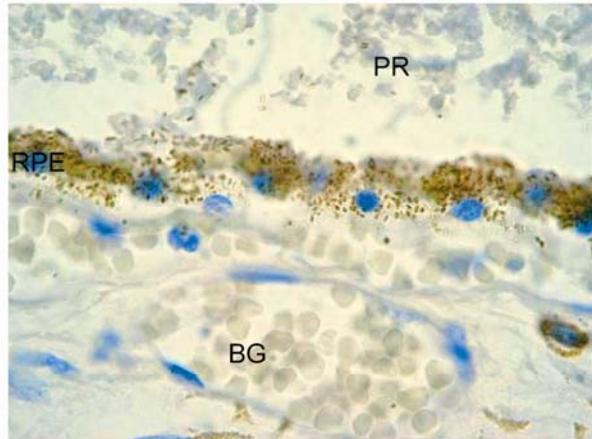


Abb. 3.14: Gewebeschnitt des humanen Auges: Immunfluoreszenznachweis von Mer Tyrosinkinase (MerTK). Es zeigte sich im Bereich des RPE und der Photorezeptoren (PS) eine positive Färbung. Die Kontrolle wurde unter Auslassung des Primärantikörpers ausgeführt. Legende: 1 = neurosensorische Retina (NF = Nervenfaser, GZ = Ganglienzellschicht, IPS = innere plexiforme Schicht, IKS = innere Körnerschicht, APS = äußere plexiforme Schicht, AKS = äußere Körnerschicht, PS = Photorezeptorschicht), 2 = retinales Pigmentepithel (RPE), 3 = Chorioidea, 4 = Sklera, BG = Blutgefäß und Ø = artifizierlicher Spalt.

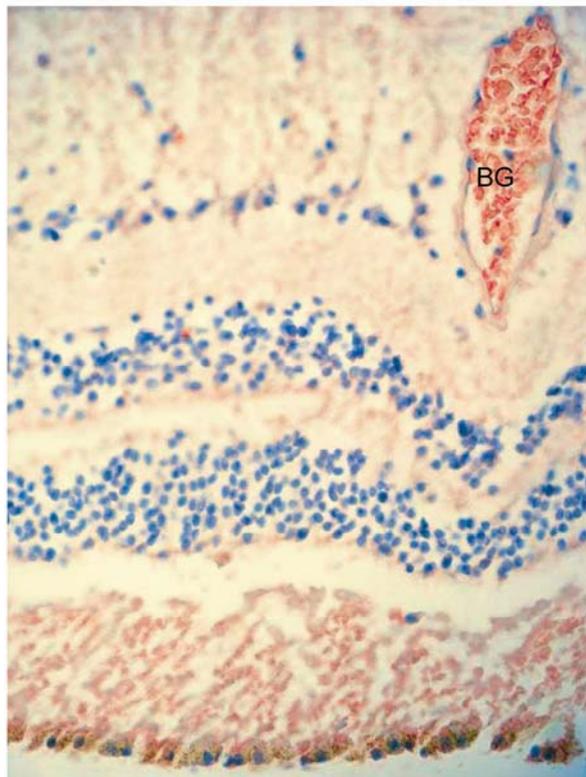
Kontrolle (63x)



Kontrolle (400x)



Gas6 Ak 1:100 (200x)



Gas6 Ak 1:100 (400x)

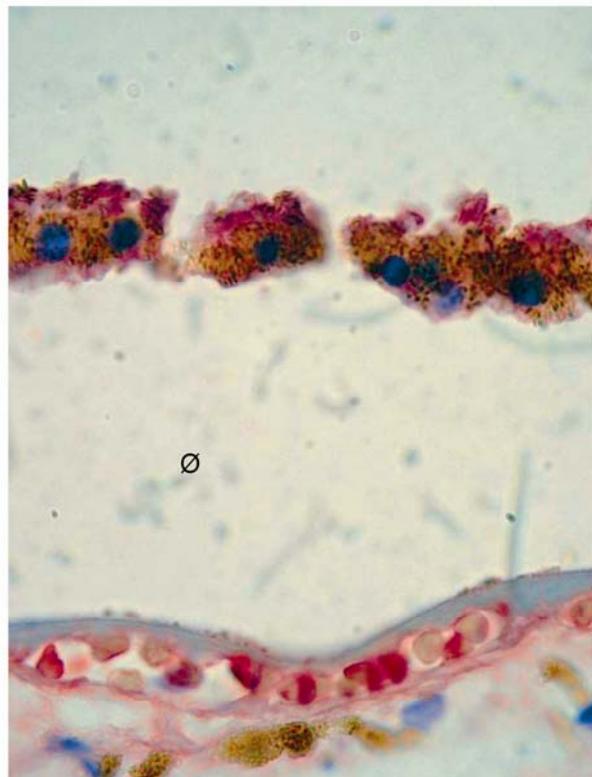


Abb. 3.15: Gewebeschnitt des humanen Auges mit dem Immunfluoreszenznachweis von Gas6, einem Liganden von MerTK. Die Färbung zeigte sich insbesondere am retinalen Pigmentepithel (RPE) sowie schwächer im Bereich der Photorezeptoren (PS). Die Kontrolle wurde unter Auslassung des Primärantikörpers ausgeführt.

Legende: 1 = neurosensorische Retina (NF = Nervenfaserschicht, GZ = Ganglienzellschicht, IPS = innere plexiforme Schicht, IKS = innere Körnerschicht, APS = äußere plexiforme Schicht, AKS = äußere Körnerschicht, PS = Photorezeptorschicht), 2 = retinales Pigmentepithel (RPE), 3 = Choroidea, 4 = Sklera, BG = Blutgefäß und Ø = artifizier Spalt.

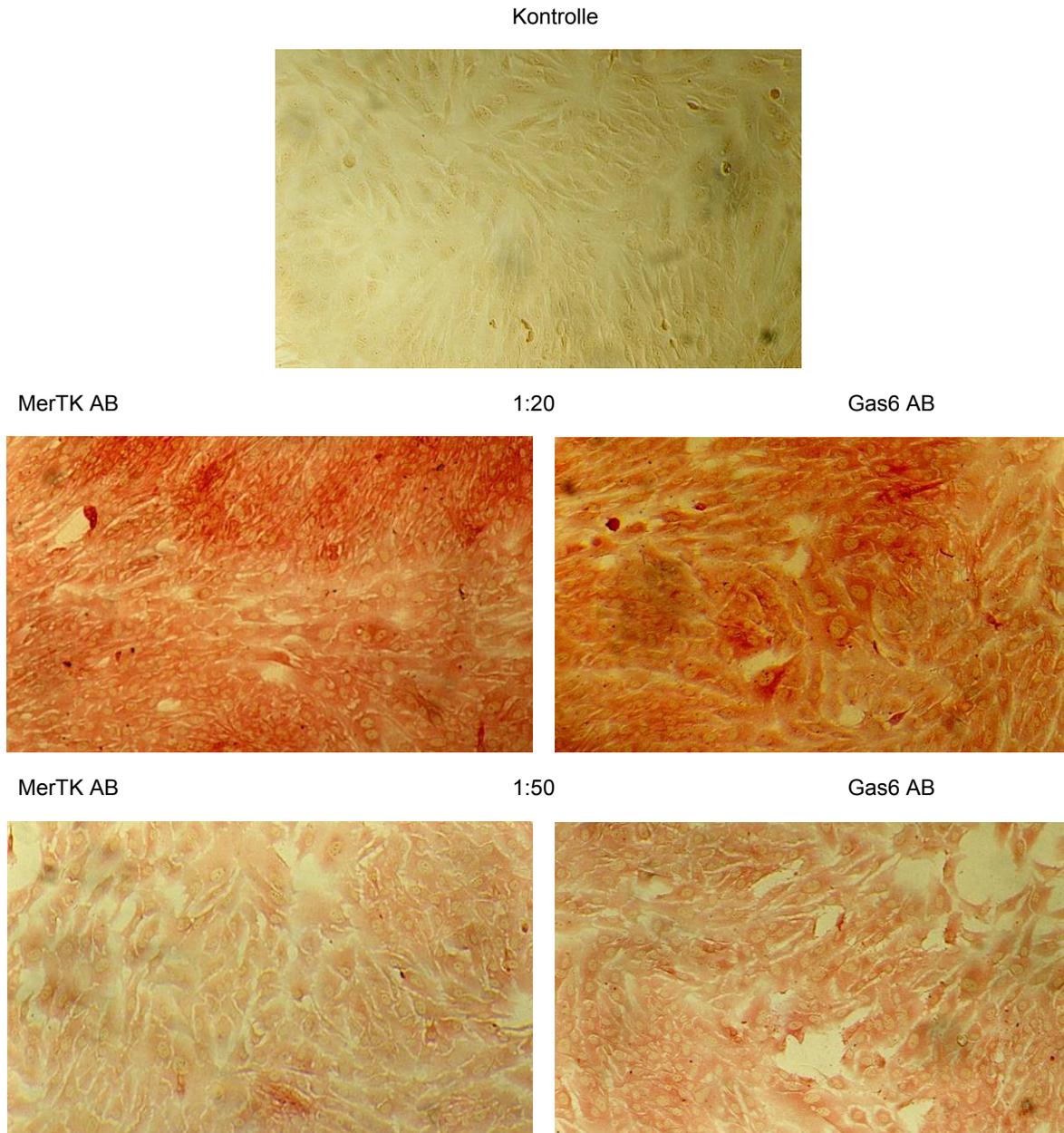


Abb. 3.16: Immunologischer Nachweis von Gas6 und MerTK an SV40-RPE in vitro bei 2 verschiedenen Antikörperverdünnungen (1:20 und 1:50). Als Kontrolle diente IgG und der Sekundärantikörper. Der Sekundärantikörper war mit AP markiert.

DIE LOKALISATION DER MER TYROSINKINASE (MERTK) SOWIE GAS6 wurde mittels Immunhistochemie untersucht. Alle Färbungen wurden dreimal unabhängig wiederholt. Als Negativkontrolle wurden die gleichen Arbeitsschritte unter Auslassung des Primärantikörpers für die Gewebeschnitte als auch für die in vitro Zellen verwendet. Dabei zeigte sich bei Verwendung der Sekundärantikörper aus dem Kaninchen in den Gewebeschnitten mehr als in den Zellkulturen eine geringe Hintergrundfärbung. Dieses wurde beim Vergleich mit der positiven Antikörperreaktion berücksichtigt. An Gewebeschnitten humaner Augen wurde in dieser Arbeit erstmals mittels immunhistochemischen Nachweis gezeigt, dass MerTK (Abb. 3.14) und Gas6 (Abb. 3.15) in humanen RPE Zellen in vivo exprimiert werden. Der Bereich der Photorezeptoreußen- und innensegmenten zeigte in den Gewebeschnitten eine moderate positive Färbung für Gas6 und eine deutlichere für MerTK. Als intrinsische Positivkontrolle für eine

Gas6 Expression konnten gefärbte Zellen in den Blutgefäßen der Retina und Choroidea identifiziert werden. Denn für Thrombozyten (Angelillo-Scherrer, et al. 2001) und weitere hämatopoetische Zellen (Graham, et al. 1994) wurde die Gas6 Expression beschrieben. In konfluenten SV40-RPE Zellkulturen wurde ebenfalls der immunhistochemische Nachweis für die Expression von MerTK als auch der von Gas6 erbracht (Abb. 3.16). Dabei spielte es keine Rolle, ob die Zellen 24 h vor den immunhistochemischen Färbungen serumfrei kultiviert wurden oder nicht.

#### 4.4.1.2 Phagozytose

DIE FUNKTIONELLE BETEILIGUNG DER MER TYROSINKINASE (MERTK) an der OS Phagozytose des humanen RPE wurde mit humanen MerTK reagierenden Antikörpern untersucht. Dafür wurden SV40-RPE Zellen serumfrei mit SNAFL<sup>®</sup>-2 markierten Photorezeptoraußensegmenten ( $5 \times 10^6$  OS pro 96er Zellkulturschalenloch) für 4 h in Gegenwart von Kontrollantikörpern (IgG 10 µg/ml) oder MerTK Antikörper (MerTK-Ak: 2.5 µg, 5 µg und 10 µg/ml) inkubiert. Der verwendete MerTK Antikörper inhibierte die Menge der aufgenommenen OS ab einer Konzentration von 5 µg/ml ( $70 \pm 5$  % SEM;  $P < 0,0001$ ) signifikant. Eine Steigerung der Antikörperkonzentration zeigte einen konzentrations-abhängigen, signifikant inhibitorischen Einfluss mit einer maximalen Senkung bei 10 µg/ml MerTK-Ak auf  $66 \pm 5$  % SEM ( $P < 0,0001$ ) der OS Aufnahme (AF) (Abb. 3.17). Es wurde auch ein Einfluss auf die OS Anbindung (AB) verzeichnet. Dieser stellte sich als konzentrationsunabhängig dar und war einer höheren Standardabweichung unterworfen als die OS Aufnahme (AF). Insgesamt war die OS Anbindung mit 5 µg/ml MerTK-Ak auf  $62 \pm 10$  % SEM ( $P < 0,0001$ ) und mit 10 µg/ml auf  $72 \pm 7$  % SEM ( $P = 0,004$ ) reduziert.

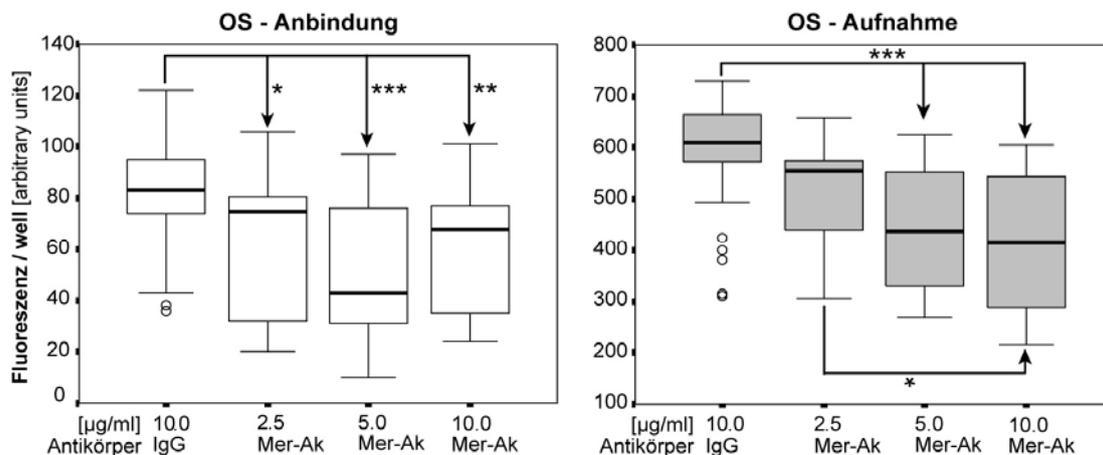


Abb. 3.17: Einfluss von MerTK Antikörper (MerTK-Ak) auf die OS Phagozytose von SV40-RPE Zellen. IgG diente als Kontrolle. Boxplotformat. Box : 50% der Daten = der Interquartilbereich; Median = schwarze dicke Linie; 1.Quartil = unterer Fehlerindikator und 4.Quartil = oberer Fehlerindikator. (Symbole: ○ Ausreiserwert, △ Extremwert, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ )

Eine weitere Frage war, ob sich unter Serumzugabe die OS Phagozytose ebenfalls durch Antikörper blockieren lässt. Die durch Serum (5 % FCS) stimulierte OS Phagozytose (4 h) der RPE Zellen konnte mittels 10 µg/ml MerTK-Ak um nur  $10 \pm 4$  % SEM inhibiert werden ( $n=3$ ;  $p < 0,05$ ). Die OS Anbindung wurde dabei nicht signifikant beeinflusst (Abb. 3.18).

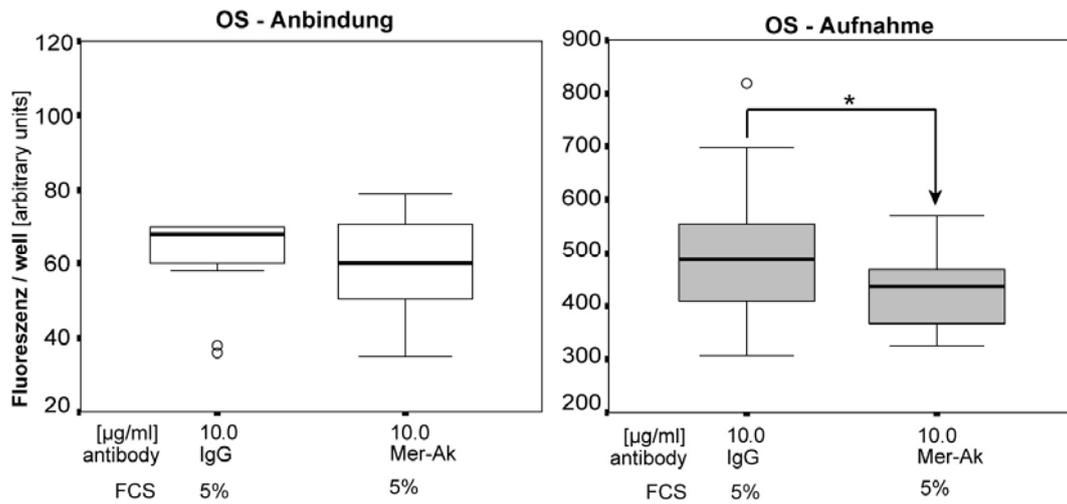


Abb. 3.18: Effekte der MerTK Antikörper (MerTK-Ak) auf die OS Phagozytose (4 h) von SV40-RPE unter Serumstimulation (FCS).

GAS6, EIN LIGAND DER MER-TYROSINKINASE. Die Beteiligung von Gas6 an der OS Phagozytose wurde mittels Gas6 spezifischen Antikörpern (Gas6-Ak) untersucht. Die Versuchsbedingungen entsprachen den MerTK Experimenten. Dafür wurden SV40-RPE Zellen serumfrei mit SNAFL®-2 markierten Phorezeptoraußensegmenten (OS) für 4 h in Gegenwart von Kontrollantikörper IgG (10 µg /ml) oder Gas6 Antikörper (Gas6-Ak: 2.5, 5 und 10 µg /ml) inkubiert.

Der verwendete Gas6-Antikörper inhibierte die Menge der aufgenommenen OS ab einer Konzentration von 2,5 µg /ml signifikant (AF  $78 \pm 4$  % SEM;  $P < 0,0001$ ) (Abb. 3.19). Unter Verwendung von 5 und 10 µg /ml Anti-Gas6 wurde die Aufnahme auf  $71 \pm 4$  % SEM ( $P < 0,0001$ ) und  $65 \pm 5$  % SEM ( $P < 0,0001$ ) gehemmt. Die Anbindung ging ab einer Antikörperkonzentration von 10 µg /ml auf  $78 \pm 7$  % SEM ( $P < 0,05$ ) zurück.

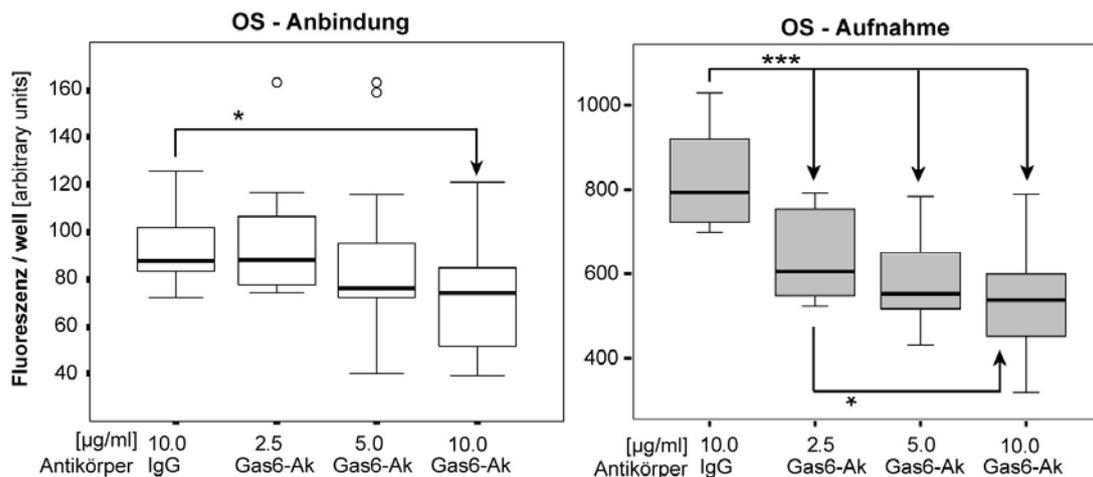


Abb. 3.19: Inhibierung des Liganden Gas6 der Mer-Tyrosinkinase (MerTK) mittels Antikörper (Gas6-Ak) und dessen Einfluss auf die OS Phagozytose (4 h) von SV40-RPE Zellen. Als Kontrolle wurde IgG verwendet.

In einer weiteren Untersuchung wurde die serumstimulierte (5 % FCS) OS Aufnahme nach 4 h mit 10 µg /ml Gas6 Antikörper auf nur  $78 \pm 5$  % SEM gehemmt ( $n=3$ ;  $p < 0,0001$ ). Die OS Anbindung blieb darunter unbeeinflusst (Abb. 3.20).

sucht und verschiedene Nifedipinkonzentrationen ausgetestet. Die RPE Zellen wurden 24 h serumfrei gehalten, 5 min mit Nifedipin vorinkubiert und dann für 4 h mit Nifedipin und OS inkubiert.

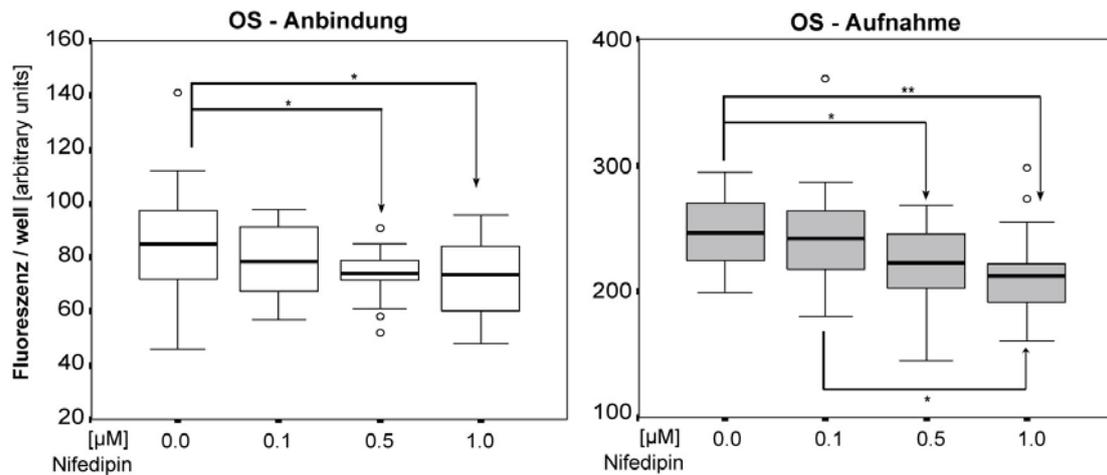


Abb. 3.22: Einfluss von Nifedipin unter serumfreien Bedingungen auf die OS Phagozytose (4 h; n=3).

Unter serumfreien Bedingungen wurde ein inhibitorischer Einfluss auf OS Aufnahme (AF  $89 \pm 3$  % SEM;  $p < 0,05$ ) und OS Anbindung (AB  $87 \pm 2$  % SEM;  $p = 0,05$ ) ab einer Nifedipinkonzentration von  $0,5 \mu\text{M}$  gemessen. Bei Konzentrationen größer als  $0,5 \mu\text{M}$  Nifedipin konnte eine Konzentrationsabhängigkeit auf die Phagozytose beobachtet werden. Bei  $1 \mu\text{M}$  Nifedipin sank die Aufnahme auf  $87 \pm 3$  % SEM ( $p < 0,05$ ) und die Anbindung auf  $85 \pm 4$  % SEM ( $p < 0,05$ ).

Der Einfluss von  $5 \mu\text{M}$  Nifedipin (Abb. 3.23) senkte die Aufnahme auf  $54 \pm 30$  % SEM ( $p < 0,00001$ ) und die Anbindung auf  $43 \pm 43$  % SEM ( $p < 0,05$ ). Bei der maximal verwendeten Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  Nifedipin war die Aufnahme auf  $44 \pm 32$  % ( $p < 0,00001$ ) und die Anbindung auf  $49 \pm 43$  % ( $p < 0,05$ ) reduziert. Auch die durch FCS stimulierte Phagozytose konnte signifikant durch L-Typ Kalziumkanalhemmung vermindert werden (Abb. 3.16). Unter 5 % FCS wurde eine Erhöhung von Aufnahme ( $293 \pm 16$  % SEM) und Anbindung ( $356 \pm 5$  % SEM) erreicht. Diese konnte nach Zugabe von  $5 \mu\text{M}$  auf  $184 \pm 14$  % SEM ( $p < 0,001$ ) Aufnahme und  $267 \pm 5$  % SEM ( $p < 0,05$ ) Anbindung reduziert werden. Bei einer FCS-Konzentration auf 10 % und  $5 \mu\text{M}$  Nifedipin sank die Aufnahme von  $335 \pm 14$  % auf  $235 \pm 29$  % ( $p < 0,00001$ ) und die Anbindung von  $304 \pm 28$  % auf  $210 \pm 7$  % ( $p < 0,05$ ).

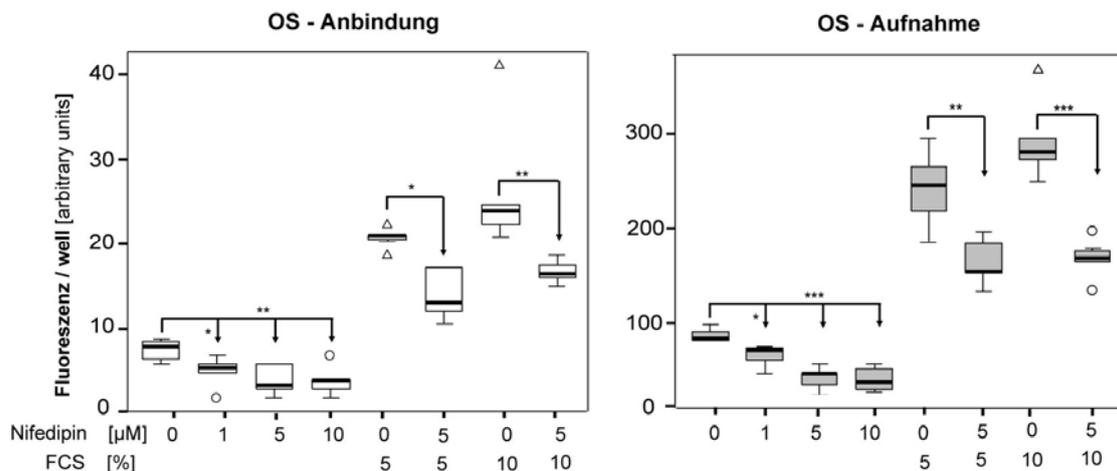


Abb. 3.23: Einfluss von Nifedipin unter serumfreier und serumstimulierter OS Phagozytose nach 4 h (n = 2).

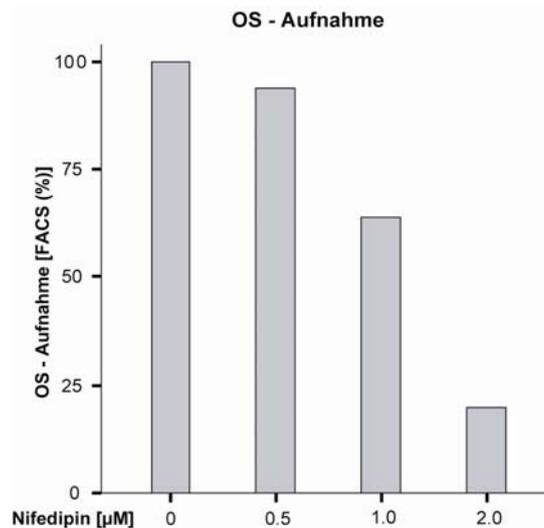


Abb. 3.24: Nifedipineinfluss auf die Phagozytose serumfreier RPE Zellen nach 1 h OS Inkubation mittels Durchflusszytometrie. (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable)

In einer zusätzlichen Untersuchung wurde der Nifedipineinfluss nach nur 1 h OS Inkubation untersucht. Mit der Zytofluorometertechnik war nach dieser Zeit kein signifikanter Unterschied messbar (Daten nicht abgebildet). Mittels FACS konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Aufnahme bei 0.5, 1.0 und 2 µM Nifedipin auf 94, 64 und 20 % ermittelt werden (Abb. 3.24).

Im nächsten Schritt war es das Ziel, die Beteiligung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen auch an Primärkulturen humaner RPE Zellen zu verifizieren. Unter serumfreien Bedingungen war im Vergleich zu den SV40-RPE Zellen eine geringere Inhibierung der OS Aufnahme durch Nifedipin an primären humanen RPE nach 4 Stunden möglich. Die Phagozytose sank auf  $82 \pm 4$  und  $77 \pm 3$  % SEM ( $p < 0,05$ ;  $p < 0,05$ ) unter 0.5 und 1.0 µM Nifedipin. Ferner wurde die serumstimulierte (5 % FCS) Aufnahme von  $171 \pm 11$  % SEM auf  $149 \pm 12$  % SEM reduziert (Abb. 3.25).

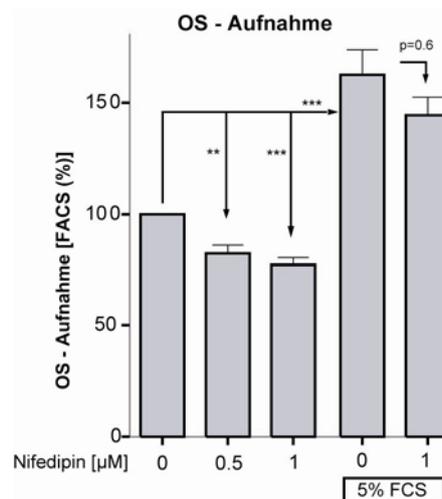


Abb. 3.25: Einfluss von Nifedipin auf serumfreie und serumstimulierte OS Phagozytose von primären humanen RPE Zellen nach 4 h ermittelt mit der Durchflusszytometrie (FACS). (n ≥ 3 siehe Tab. im Anhang 8.3)

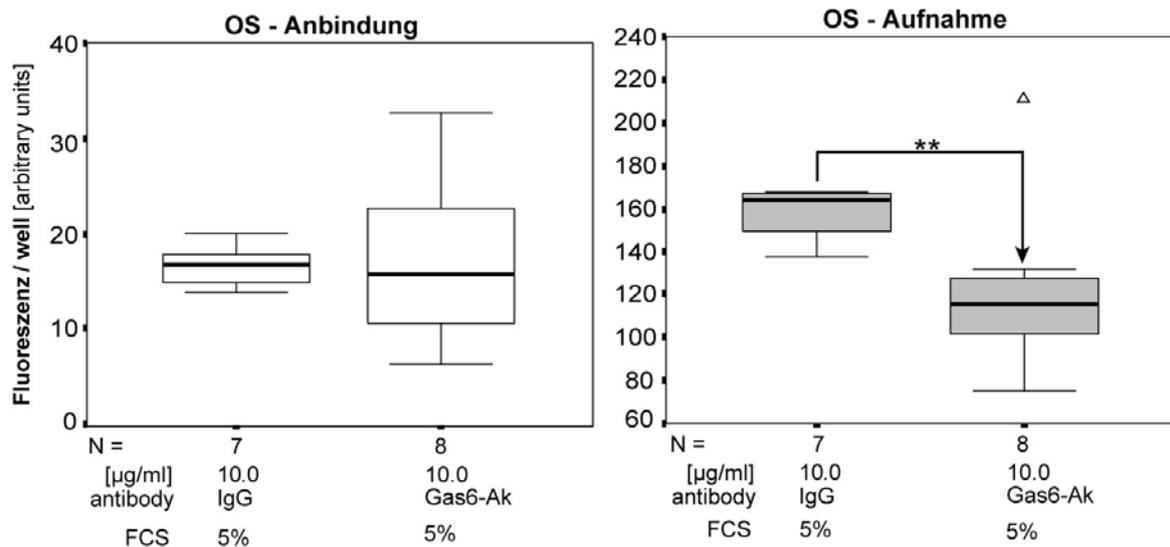


Abb. 3.20: Inhibierung des Liganden Gas6 der Mer-Tyrosinkinase (MerTK) mittels Antikörper (Gas6-Ak) und deren Einfluss auf die serumstimulierten OS Phagozytose von SV40-RPE Zellen.

Für die Versuche mit MerTK-Ak und Gas6-Ak wurden FACS Messungen durchgeführt. Dabei konnte ebenfalls eine Abnahme der OS Aufnahme um 10%, 34% und 40% unter 2.5, 5 und 10 µg/ml MerTK-Ak ermittelt werden. Ebenso konnte unter den gleichen Konzentrationen der Gas6 Antikörper die OS Aufnahme um 23%, 34% und 45% inhibieren (Abb. 3.21).

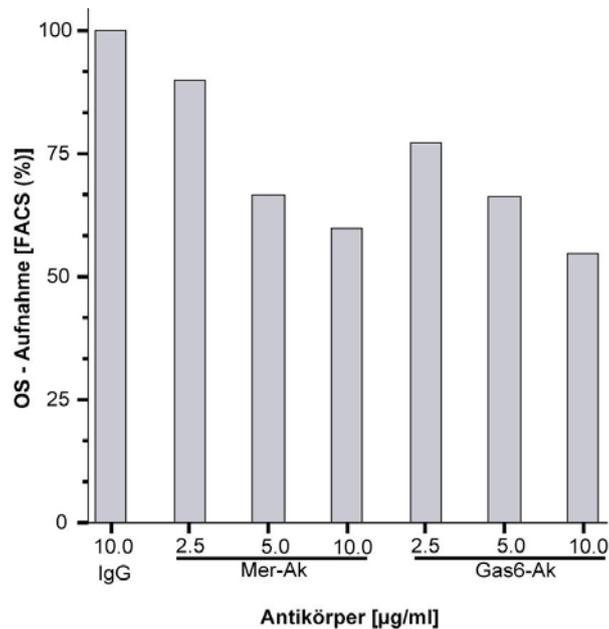


Abb. 3.21: Verifizierung der Daten zur Beteiligung der Mer-Tyrosinkinase (MerTK) und dessen Liganden Gas6 an der OS Phagozytose (4 h) mittels Durchflusszytometrie (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable)

#### 4.4.2. Beteiligung des L-Typ $Ca^{2+}$ - Kanal

SPANNUNGSABHÄNGIGE NEUROENDOKRINE L-TYP KALZIUMKANÄLE werden von humanen RPE Zellen exprimiert. Es sollte untersucht werden, ob Nifedipin sensitive Kalziumkanäle bei der Phagozytose von RPE Zellen involviert sind. In einer ersten Versuchreihe (Abb. 3.22) wurden SV40-RPE Zellen unter-

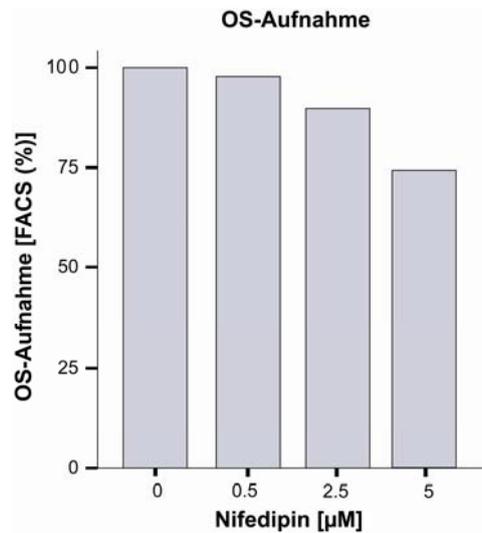


Abb. 3.26: FACS: Nifedipineinfluss unter serumfreien Bedingungen auf die Phagozytose primären humanen RPE nach 1 h OS Inkubation. (n=1; Daten einer Messung von >10'000 Zellen aus 8 Repetitionen pro Variable)

Um zu überprüfen, ob der Einfluss von Nifedipin auch schon nach 1 h auf primäre humane RPE Zellen einen inhibitorischen Einfluss hat wurde die Phagozytose mittels FACS quantifiziert. Dort ergab sich folgendes Bild: im Vergleich zu den Beobachtungen an SV40-RPE Zellen (Abb. 3.26) konnte die OS Aufnahme humanen primären RPE eines Spenders auf nur 74 % mit 5 µM Nifedipin reduziert werden. Zusammenfassen konnte gezeigt werden, dass Nifedipin die Phagozytose humaner SV40-RPE als auch primärer RPE Zellen unter serumfreien Bedingungen konzentrationsabhängig hemmt. Dabei ist der Effekt nach 1 Stunde OS Inkubation größer als nach 4 Stunden. Die serumstimulierte Phagozytose stellte sich ebenfalls sensitiv auf Nifedipin dar. In allen Fällen wurden die OS Anbindung und die OS Aufnahme moduliert.

#### 4.4.3. Beteiligung von Proteintyrosinkinasen

DIE ZYTOSOLISCHE PP60<sup>C-SRC</sup> PROTEINTYROSINKINASEN (PTK) wird durch Herbimycin A (HA) das an reaktive SH-Gruppen bindet nach 24 h Vorinkubation irreversibel hemmt.

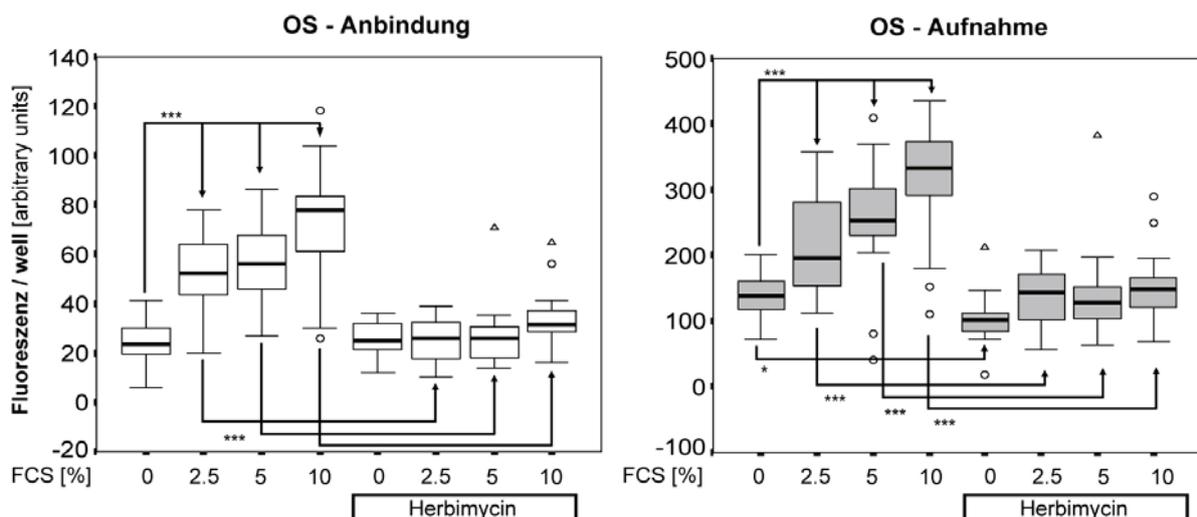


Abb. 3.27: Einfluss von PTK Inhibitor Herbimycin A auf OS Phagozytose von SV40-RPE Zellen nach 4 h unter serumfreien und -haltigen (FCS) Bedingungen (n=3)

Bei den folgenden Versuchen wurde der PTK Inhibitor HA unter serumfreien und –haltigen Bedingung auf die SV40-RPE Phagozytose untersucht. Dabei wurde unter Serumfreiheit (0 % FCS) die Anbindung nicht beeinflusst ( $102 \pm 6$  % SEM), aber die Aufnahme auf  $73 \pm 7$  % SEM ( $p < 0,05$ ) reduziert (Abb. 3.27). Der Serumeffekt mit 2.5, 5 und 10 % blieb nach Vorinkubation mit HA aus (Abb. 3.27).

Ein additiver Einfluss von Inhibition des L-Typ Kanal und Inhibition von PTK war unter serumfreien Bedingungen nach 4 h und 12 h OS Inkubation nicht zu beobachten. Dabei war der Unterschied nach 4 h OS Aufnahme (AF) und Anbindung (AB) unter HA (AF  $73 \pm 6$  % SEM, AB  $80 \pm 6$  % SEM) im Vergleich zu HA und Nifedipin (AF  $65 \pm 8$  % SEM, AB  $75 \pm 8$  % SEM) nicht signifikant (Abb. 3.28-29).

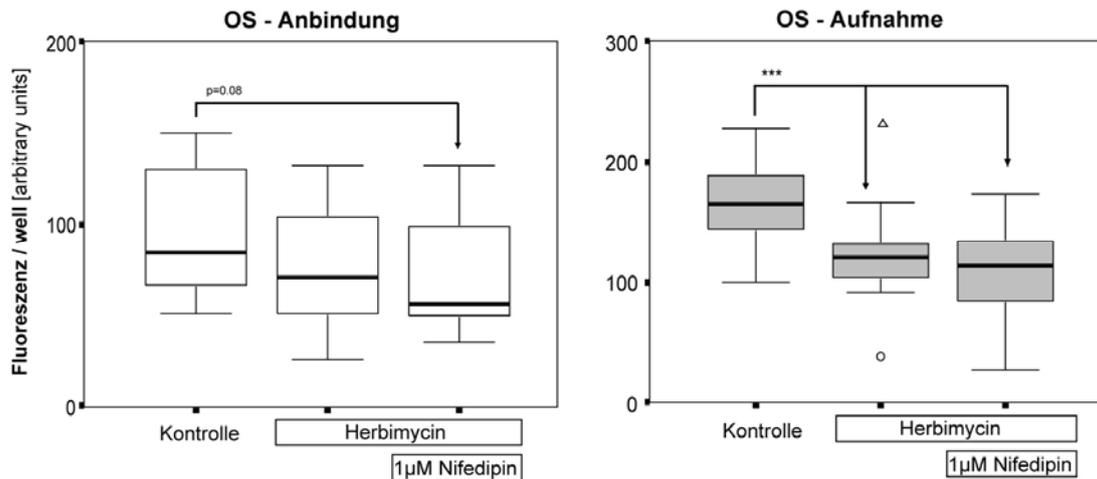


Abb. 3.28: Wirkung von Nifedipin und PTK Inhibitor Herbimycin A auf OS Phagozytose SV40-RPE nach 4 h (n=3).

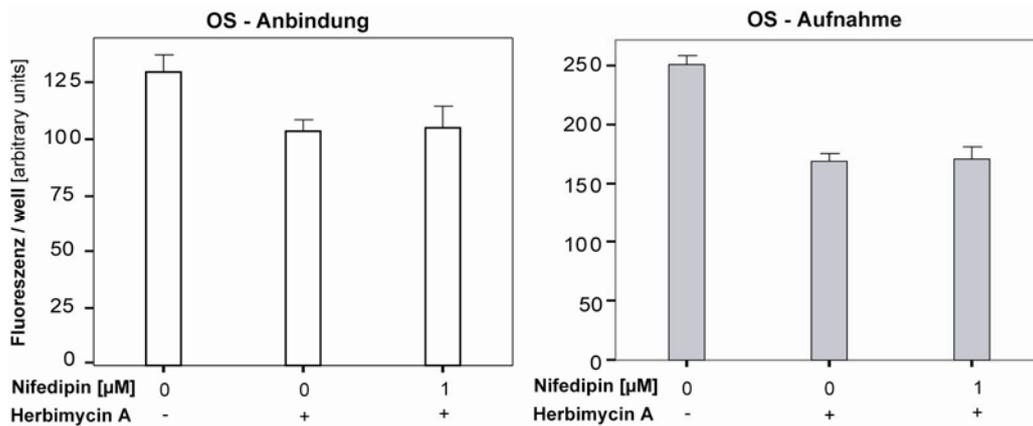


Abb. 3.29: Wirkung von Nifedipin und Herbimycin A auf OS Phagozytose SV40-RPE Zellen nach 12 h (n=1, 8 Repetitionen, Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen pro Variable).

In einem Experiment wurde die additive Applikation von Nifedipin und Herbimycin A zu einem frühen Zeitpunkt der Phagozytose (1 h) mittels Durchflusszytometrie untersucht. Es zeigte sich im Gegensatz zur Messung nach 4 h, dass die Kombination von HA und Nifedipin eine um 19 % stärkere Inhibition vergleichend zu HA allein erzielte (Abb. 3.30).

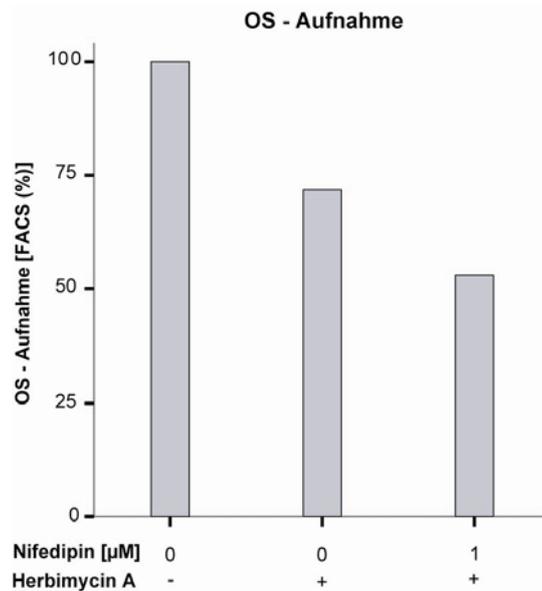


Abb. 3.30: Wirkung von Nifedipin und PTK Inhibitor Herbimycin A auf OS Phagozytose SV40-RPE Zellen nach 1 h. (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable)

In der Durchflusszytometrie zeigte die Phagozytose humaner primärer RPE Zellen ein zu SV40-RPE Zellen äquivalentes Bild. Herbimycin A senkte die Phagozytoserate unter serumfreien Bedingungen ( $69 \pm 9$  % SEM;  $P=0,05$ ) sowie inhibierte die Serumstimulation (5 % FCS) von  $160 \pm 18$  % SEM auf  $114 \pm 14$  % SEM ( $P<0,001$ ) nach 4 Stunden (Abb. 3.31).

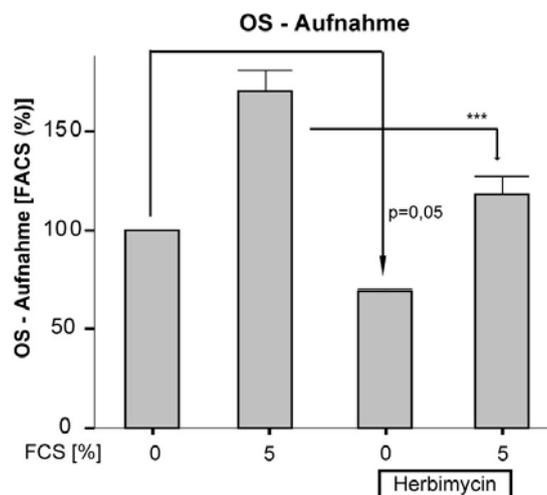


Abb. 3.31: Wirkung von PTK Inhibitor Herbimycin A auf OS Phagozytose humaner primärer RPE Zellen nach 4 h in Kultur mit OS. (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable)

Desweiteren wurde in einem ersten Versuch ein möglicher additiver Effekt von HA und Nifedipin auch an humanen primären RPE untersucht. Nifedipin (5 µM) reduzierte die Phagozytose um 26 % und HA um 18 %. Die Applikation von beiden resultierte in einer 17 %igen Inhibierung (Abb. 3.32).

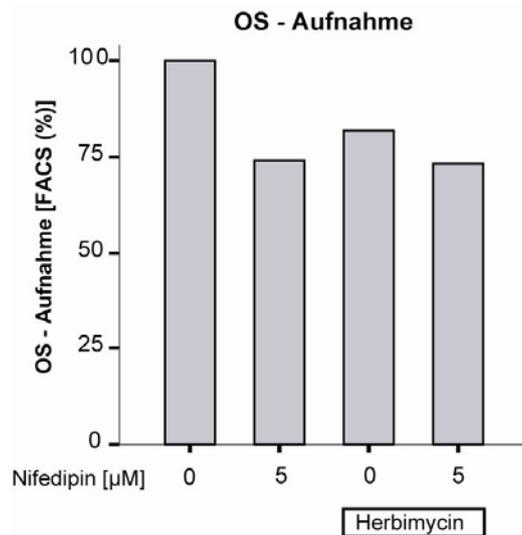


Abb. 3.32: Wirkung von PTK Inhibitor Herbimycin A auf OS Phagozytose humaner primärer RPE Zellen nach 4 h in Kultur mit OS. (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable)

Resümierend konnte gezeigt werden, dass Herbimycin A unter serumfreien Bedingungen die OS Aufnahme von SV40-RPE und primären RPE nach 1, 4 und 12 Stunden OS Inkubation signifikant inhibiert. Die Anbindung zeigte sich erst nach 12 Stunden moderat gemindert. Die durch Serumzugabe sonst beobachtete Stimulation der Phagozytose bleibt unter Herbimycin A aus. Ein additiver Effekt von Nifedipin und Herbimycin A stellte sich nach 4 Stunden Phagozytose nicht dar.

#### 4.4.4. Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF) wurde für 30 min nach serumfreier Vorinkubation (12h) der Zellen appliziert. Die Phagozytose wurde unter Zugabe von OS und erneutem bFGF begonnen. Die Aufnahme war nach 4 h unter 1, 10 oder 100 ng/ml bFGF nicht signifikant verändert. Die Anbindung hingegen war unter 10 ng/ml reduziert auf  $82 \pm 10\%$  SEM ( $p < 0,05$ ) nach 4 h (Abb. 3.33).

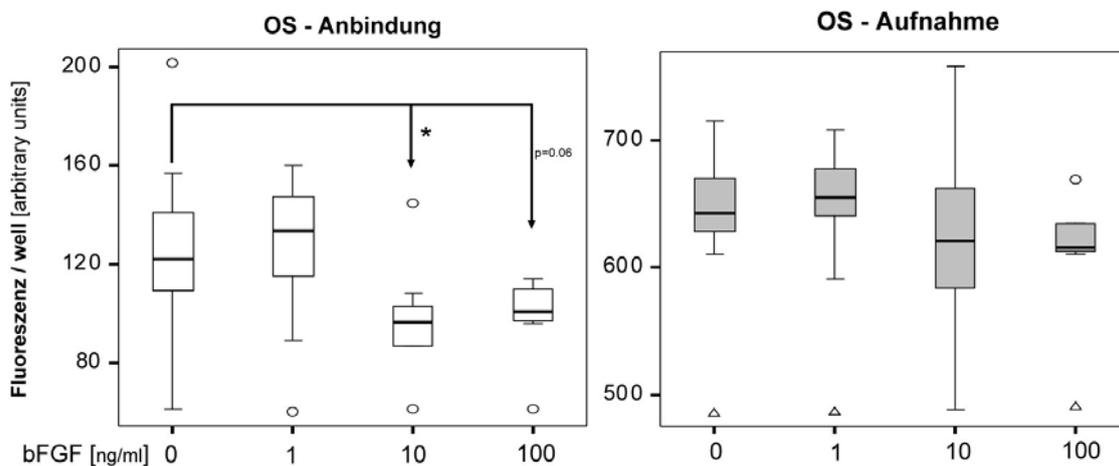


Abb. 3.33: Einfluss von bFGF (30 min Vorinkubation) auf die OS Phagozytose (4 h) von SV40-RPE Zellen (n=3).

Um zu überprüfen, ob ein möglicher bFGF Effekt auf die OS Aufnahme nur initial zu messen ist (Abb. 3.34), wurde nach 1 h gestoppt und dann die Phagozytose mittels Durchflusszytometrie bestimmt. 30 min bFGF Vorinkubation (5 ng/ml) ergab eine auf  $78 \pm 8$  % SEM ( $p < 0,001$ ) verminderte OS Phagozytose. Mit 10 ng/ml bFGF sank die OS Aufnahme auf  $84 \pm 10$  % SEM ( $P < 0,001$ ). Mit 100 ng/ml bFGF erzielte man eine Reduktion auf  $66 \pm 3$  % SEM im Vergleich zur Kontrolle ( $p < 0,00001$ ).

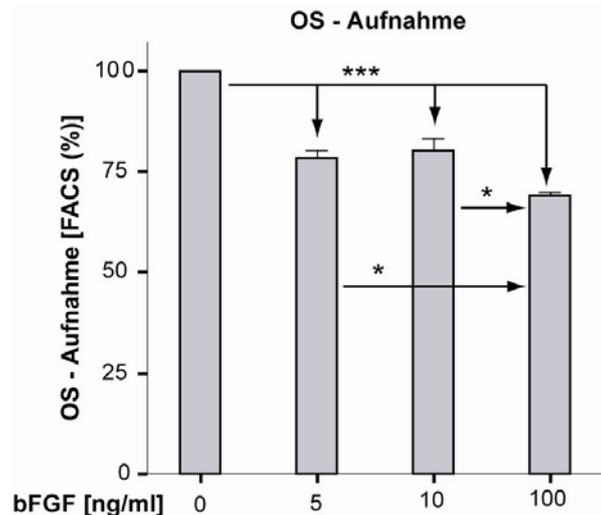


Abb. 3.34: FACS Messung: Einfluss von bFGF (30 min Vorinkubation) auf die OS Phagozytose (1 h) von SV40-RPE Zellen (n=3).

In einer weiteren Messung wurde der Einfluss einer 30 min bFGF Stimulation nach HA Vorinkubation untersucht. Nach 1 h ist die SV40-RPE Phagozytose um 28 % durch HA und um 55 % durch HA und bFGF reduziert (Abb. 3.35). Die Phagozytose (1 h) primären humanen RPE wurde durch bFGF um 7 %, durch HA um 18 % und bFGF mit HA um 21 % reduziert (Abb. 3.36).

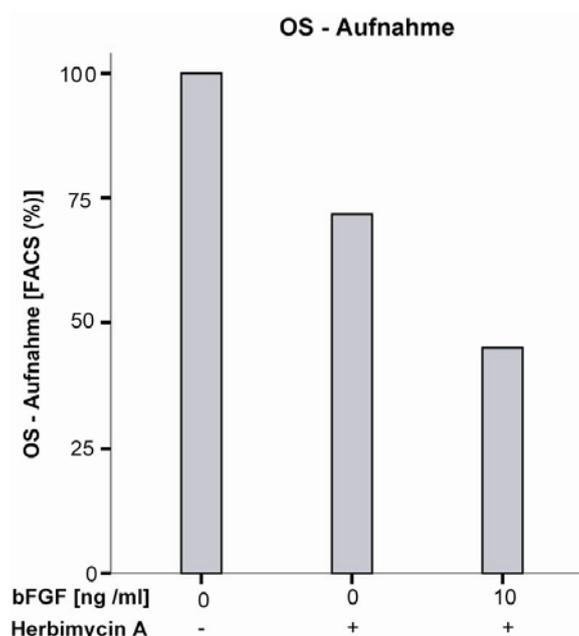


Abb. 3.35: FACS Messung: Einfluss von bFGF (30 min Vorinkubation) und Herbimycin A auf die OS Phagozytose (1 h) von SV40-RPE Zellen (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable).

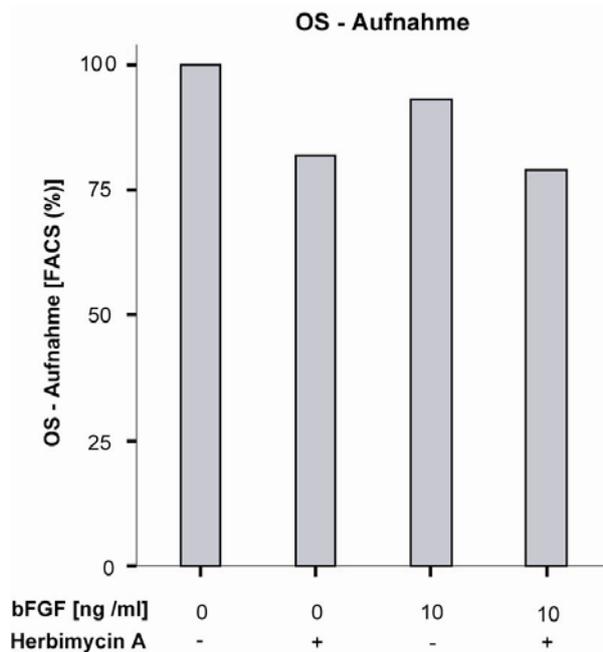


Abb. 3.36: FACS Messung: Einfluss von bFGF (30 min Vorinkubation) und Herbimycin A auf die OS Phagozytose (1 h) von humaner primärer RPE Zellen (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable).

In der Zusammenfassung konnte ein moderater inhibierender Einfluss von bFGF nach 4 Stunden Phagozytose auf die Anbindung und nach 1 Stunde auch auf die Aufnahme beobachtet werden.

#### 4.4.5. Versuche an primären Kontrollratten-RPE

In einem exemplarischen Kontrollexperiment wurde der Einfluss von PTK und L-Typ Kalziumkanal auch an Kontrollratten-RPE mit der Durchflusszytometrie untersucht. Nach 4 h OS Inkubation war die Phagozytose in Gegenwart von 5 % FCS auf 147 % angestiegen. Die serumstimulierte Phagozytose betrug nach Vorinkubation mit PTK Inhibitor Herbimycin (HA) nur 79 % und in Gegenwart von 0.5 bzw. 1.0  $\mu$ M Nifedipin auf 143 und 86 % im Vergleich zur serumfreien Kontrolle (100%). Serumfrei reduzierte HA die Phagozytose auf 24 % und 0.5 bzw. 1.0  $\mu$ M Nifedipin auf 83 bzw. 65 % (Abb. 3.37).

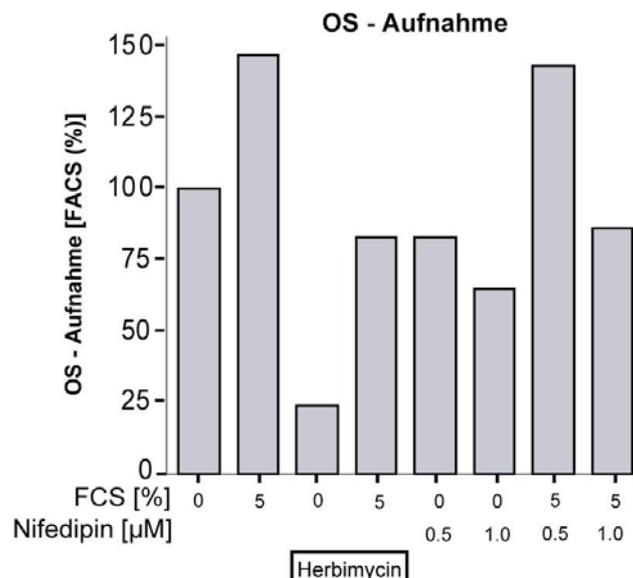


Abb. 3.37: Einfluss von FCS, PTK Inhibition durch Herbimycin (HA) und L-Typ Kalziumkanalinhibition mittels Nifedipin auf die OS Phagozytose von Kontrollratten-RPE Zellen (4 h) (n=1; Daten aus einer Messung von >10'000 Zellen der 8 Repetitionen pro Variable).

## 4.5. Pathophysiologie der RPE Phagozytose

### 4.5.1. Phagozytosedefizit durch MerTK Mutation

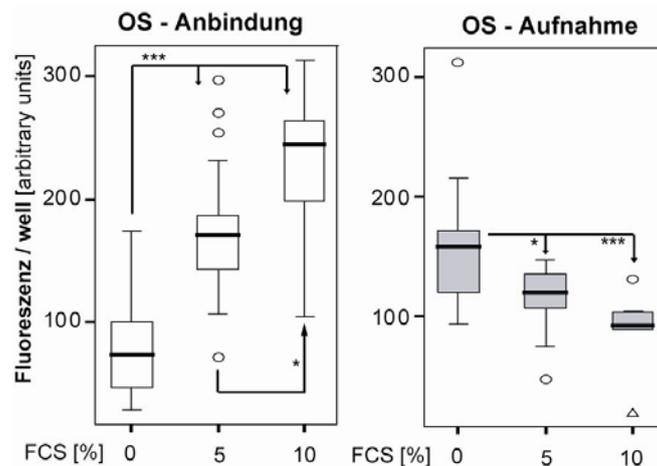


Abb. 3.38: Einfluss von FCS auf die OS Phagozytose (4 h) von RCS-RPE Zellen (n = 3).

Aufgrund der fehlenden MerTK ist die Phagozytose nicht mehr durch die auch in Serum vorhandenen Rezeptorliganden Gas6 und Protein S stimulierbar. Dennoch besteht eine geringe Phagozytoserate in vitro, die unter Serumfreiheit sogar etwas größer ist als bei gesunden RPE Zellen (Edwards, et al. 1986). Das hier verwendete in vitro System der RCS-RPE Phagozytose wurde durch die fehlende Serumstimulation validiert. Konträr zu gesunden RPE Zellen (Abb. 3.38) wurde die Aufnahme unter 5 % Serum auf  $78 \pm 4$  % SEM ( $p < 0,05$ ) reduziert. Die OS Anbindung wurde währenddessen auf  $210 \pm 6$  % SEM ( $p < 0,00001$ ) erhöht.

### 4.5.2. Beteiligung des L-Typ $Ca^{2+}$ - Kanal

Unter Zugabe von  $0.5 \mu\text{M}$  Nifedipin war ein signifikanter Anstieg der Phagozytose zu beobachten (AF  $174 \pm 4$  SEM,  $p < 0,0001$  und AB  $251 \pm 4$  SEM,  $p < 0,001$ ). Die Applikation von  $1 \mu\text{M}$  Nifedipin produzierte eine auf  $165 \pm 4$  % SEM (AF;  $p < 0,00001$ ) und  $256 \pm 4$  % SEM (AB;  $p < 0,00001$ ) erhöhte Phagozytose im Vergleich zur serumfreien Kontrolle. Eine maximale Anbindung wurde bei  $2 \mu\text{M}$  Nifedipin auf  $303 \pm 10$  % SEM ( $p < 0,00001$ ) erzielt ohne eine Steigerung der Aufnahme ( $162 \pm 13$  % SEM) zu bewirken (Abb. 3.39)

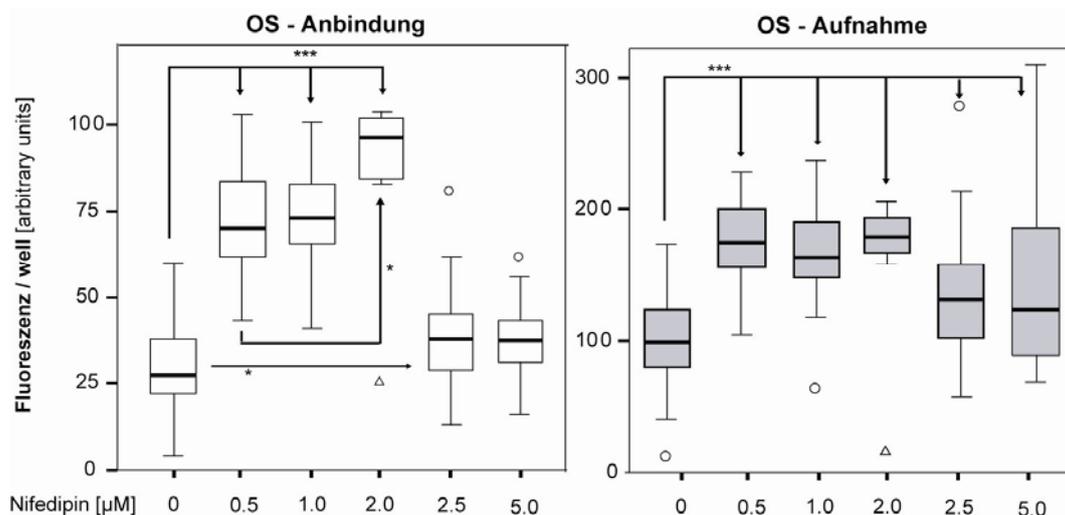


Abb. 3.39: Einfluss von Nifedipin auf die Phagozytose (4 h) von RCS-RPE ( $n \geq 3$ ; siehe Tab. im Anhang 8.3).

Wie schon unter 4.5.2 dargelegt, wiesen die RCS-RPE Zellen aufgrund des Gendefektes keine Serumstimulierbarkeit auf. Die unter 5 % FCS beobachtete Phagozytose beträgt  $78 \pm 4$  % SEM (AF) und  $210 \pm 6$  % SEM (AB) im Vergleich zur serumfreien Kontrolle (100 %). Mit 5 % FCS und 0.5  $\mu\text{M}$  Nifedipin maß die Aufnahme  $103 \pm 6$  % SEM und die Anbindung  $189 \pm 3$  %. Der Unterschied in der Aufnahme unter 5 % FCS mit und ohne Nifedipin war signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Nifedipin steigerte die Phagozytose weiter auf  $120 \pm 4$  % (Aufnahme;  $p < 0,05$ ) und  $279 \pm 2$  % (Anbindung;  $p < 0,00001$ ). Mit 2  $\mu\text{M}$  Nifedipin bei gleich bleibender FCS Konzentration wurde eine Aufnahme von  $123 \pm 3$  % SEM ( $p < 0,001$ ) und eine Anbindung von  $303 \pm 3$  % SEM ( $p < 0,001$ ) bewirkt (Abb. 3.40).

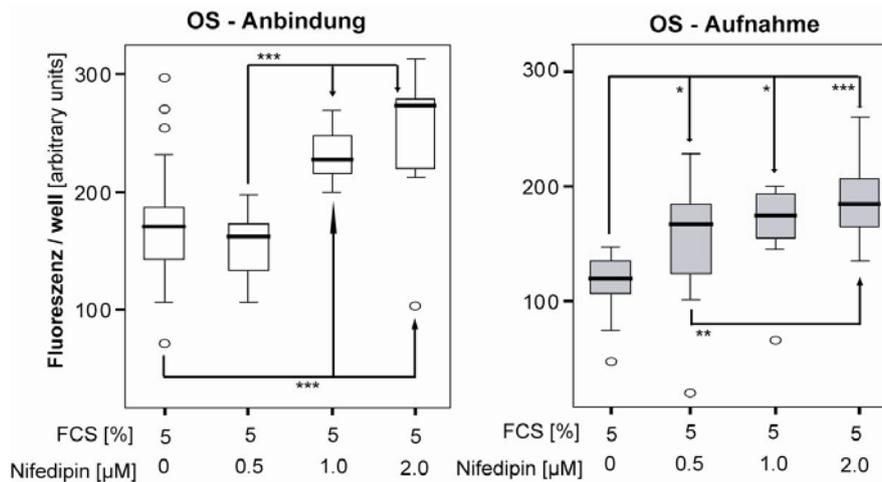


Abb. 3.40: Einfluss von Nifedipin in Gegenwart von FCS auf die OS Phagozytose (4 h) von RCS-RPE (n=3).

Die RPE Zellen den dargestellten Versuchen wurden der Durchflusszytometrie zugeführt. Es zeigten sich qualitativ die gleichen Effekte von FCS und Nifedipin auf die Aufnahme (Abb. 3.41). Die Reduktion durch 5 bzw. 10 % FCS stellte sich kleiner dar ( $80 \pm 12$  bzw.  $66 \pm 10$  %;  $p = 0,02$  bzw.  $p = 0,0002$ ). Die Steigerung unter 0.5, 1 und 2  $\mu\text{M}$  Nifedipin ohne FCS maß geringer ( $127 \pm 10$ ,  $137 \pm 9$  und  $145 \pm 7$  %; alle mit  $p < 0,00001$ ). Die Zunahme durch genannte Nifedipinkonzentrationen mit 5 % FCS fiel kleiner aus ( $95 \pm 8$ ,  $100 \pm 9$  und  $105 \pm 10$  %;  $p = 0,14$ ,  $p = 0,01$  und  $p = 0,01$ )

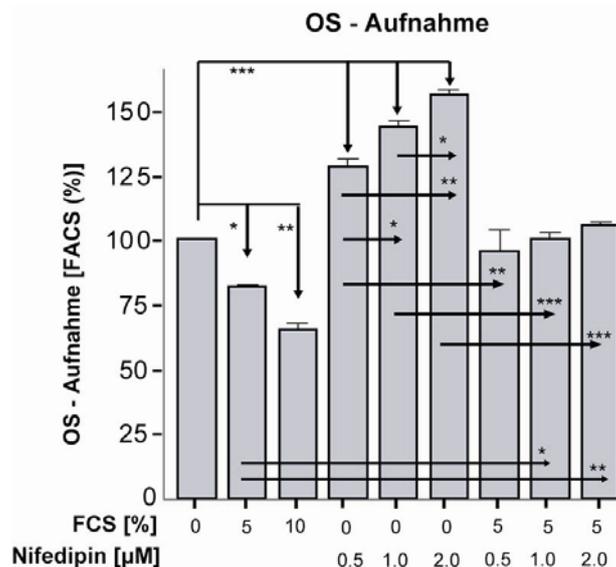


Abb. 3.41: FACS Messung: Nifedipineffekt mit /ohne FCS auf die RCS-RPE -Phagozytose (4 h; n=3).

Der Einfluss von Nifedipin auf die Phagozytose über einen längeren Zeitraum wurde in einem Experiment beobachtet. Im Gegensatz zu den Messungen nach 1 und 4 Stunden war nach 12 Stunden die Aufnahme unter 2,5  $\mu\text{M}$  ( $60 \pm 26 \%$ ) sowie 5  $\mu\text{M}$  Nifedipin ( $46 \pm 19 \%$ ) und die Anbindung bei 2,5  $\mu\text{M}$  ( $64 \pm 24 \%$ ) sowie 5  $\mu\text{M}$  Nifedipin ( $48 \pm 24 \%$ ) reduziert (Abb. 3.42).

Zusammenfassend wurde die Phagozytose des RCS-RPE durch Blockierung von L-Typ Kalziumkanälen mit Nifedipin initial gesteigert. Dieser Effekt war auf die OS Anbindung größer als auf die Aufnahme und jeweils mit und ohne Serumzugabe zu beobachten. Die inhibierende Wirkung des Serums und die stimulierende des Nifedipin stellten sich additiv dar.

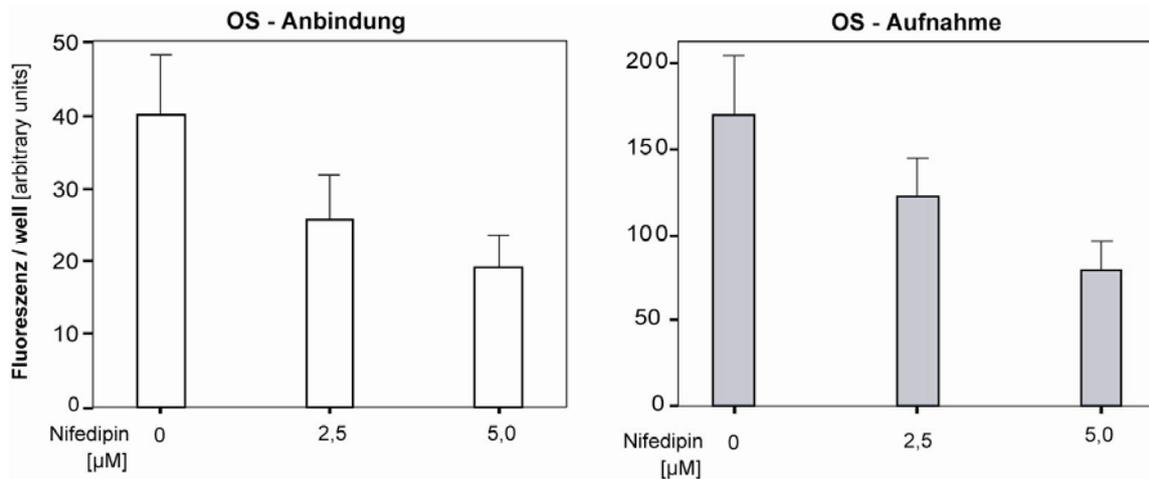


Abb. 3.42: Einfluss von Nifedipin auf die OS Phagozytose (12 h) von RCS-RPE Zellen ( $n=1 \times 8$  Replikationen).

#### 4.5.3. Beteiligung von Proteintyrosinkinasen

Eine PTK Inhibition mit Herbimycin A (10  $\mu\text{M}$ , 12 h Vorinkubation) inhibierte die serumfreie OS Phagozytose (AB  $76 \pm 10 \%$  SEM,  $P=0,002$ ; AF  $69 \pm 8 \%$  SEM,  $P=0,002$ ). Dieser Effekt resultierte insbesondere auch in Gegenwart von 5% FCS (AB  $186 \pm 12 \%$  SEM; AF  $81 \pm 6 \%$  SEM) in der Abnahme von Anbindung (AB:  $104 \pm 12 \%$  SEM,  $p<0,00001$ ) und Aufnahme (AF:  $60 \pm 6 \%$  SEM,  $P=0,0002$ ) der Phagozytose (Abb. 3.43)

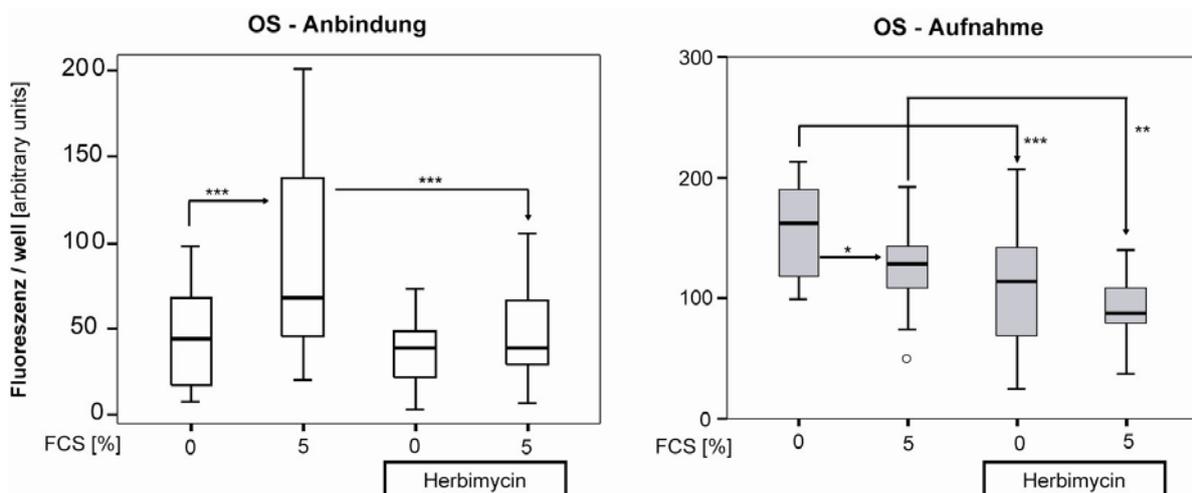


Abb. 3.43: Einfluss von Herbimycin (24 h Vorinkubation) auf die OS Phagozytose (4 h) von RCS-RPE Zellen ( $n \geq 3$ ).

Die Aufnahmekapazität der RPE Zellen aus den zuletzt gezeigten Versuchen wurde nochmals in der Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 3.44). Auch hier zeigte sich der negative Einfluss von FCS auf die Phagozytose (5 % FCS:  $84 \pm 11$  % SEM und 10 % FCS:  $57 \pm 23$  % SEM). Des Weiteren konnte auch die Reduktion der Phagozytose unter PTK Inhibition verifiziert werden (serumfrei:  $74 \pm 23$  % SEM sowie unter 5 % FCS:  $55 \pm 18$  % SEM).

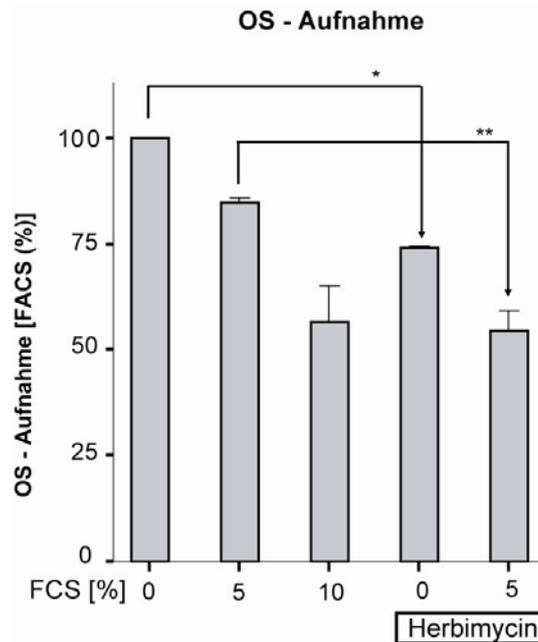


Abb. 3.44: FACS Messung: Einfluss von Herbimycin auf die OS Phagozytose (4 h) von RCS-RPE Zellen (n=3).

In einem Experiment wurde der Einfluss von Herbimycin A nach 12 Stunden OS Phagozytose gemessen. Die Phagozytose (Aufnahme  $12 \pm 7$  %; Anbindung  $28 \pm 14$  %) wurde vollständig inhibiert (Abb. 3.45).

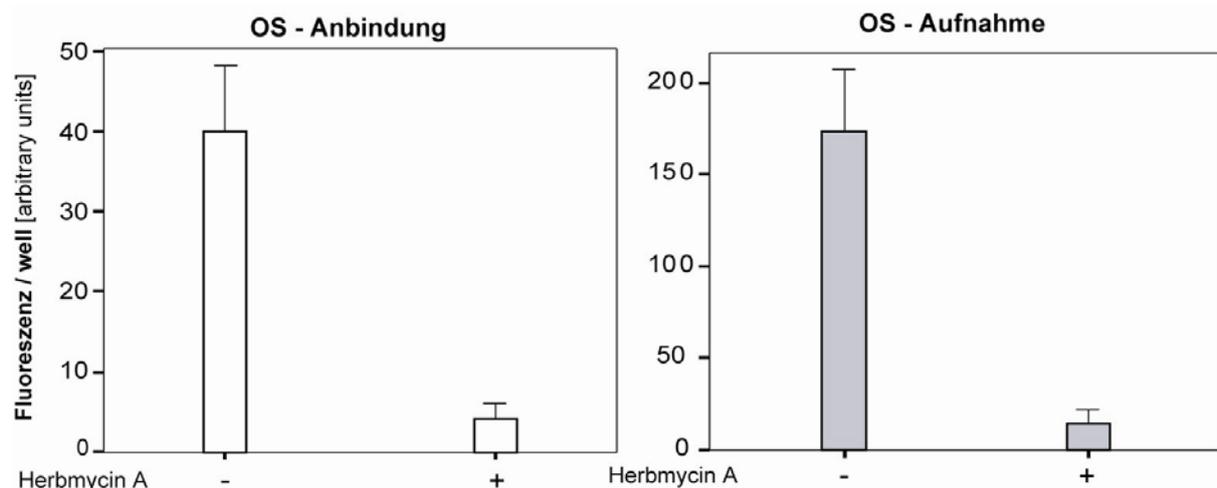


Abb. 3.45: Einfluss von Herbimycin (24 h Vorinkubation) auf die OS Phagozytose (12 h) von RCS-RPE. (n=1 x 8 Replikationen).

Zusammenfassend wurde durch PTK Inhibition mittels Herbimycin A die Phagozytose des RCS-RPE gesenkt. Unter Serumzugabe war eine zusätzliche signifikante Senkung der Phagozytose zu beobachten.

#### 4.5.4. Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF

BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF) stimulierte nach 24 h Vorinkubation mit 10 und 100 ng/ml bFGF die Aufnahme (AF) auf  $156 \pm 12$  % und  $208 \pm 14$  % sowie die Anbindung auf  $170 \pm 14$  % und  $237 \pm 17$  % nach 4 h OS Phagozytose (Abb. 3.46).

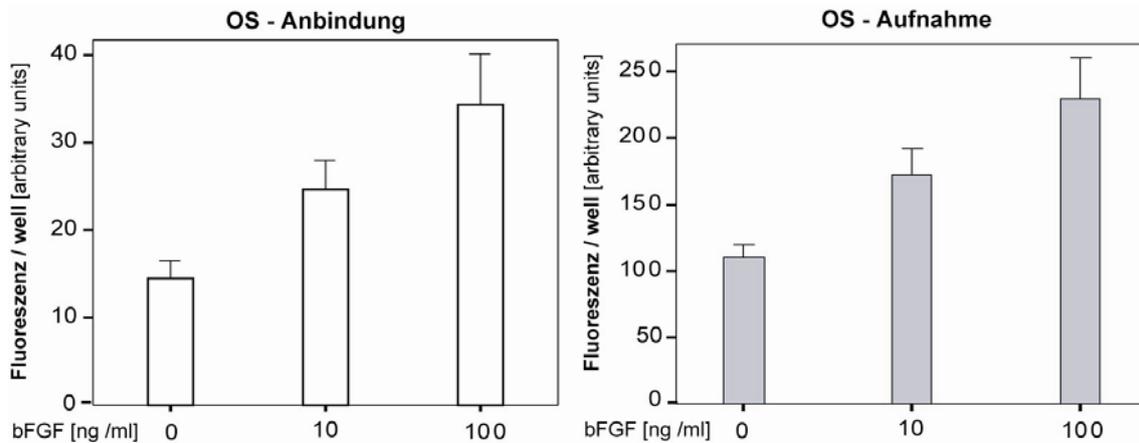


Abb. 3.46: bFGF Einfluss (24h Vorinkubation) auf die Phagozytose (4 h) von RCS-RPE (n=1 x 8 Replikationen).

Auch nach 12 h Phagozytose konnte die Zunahme von Aufnahme und Anbindung im Vergleich zur Kontrolle ohne bFGF noch beobachtet werden (Abb. 3.47). 100 ng/ml bFGF steigerte die Aufnahme auf  $205 \pm 5$  % und die Anbindung auf  $245 \pm 17$ %.

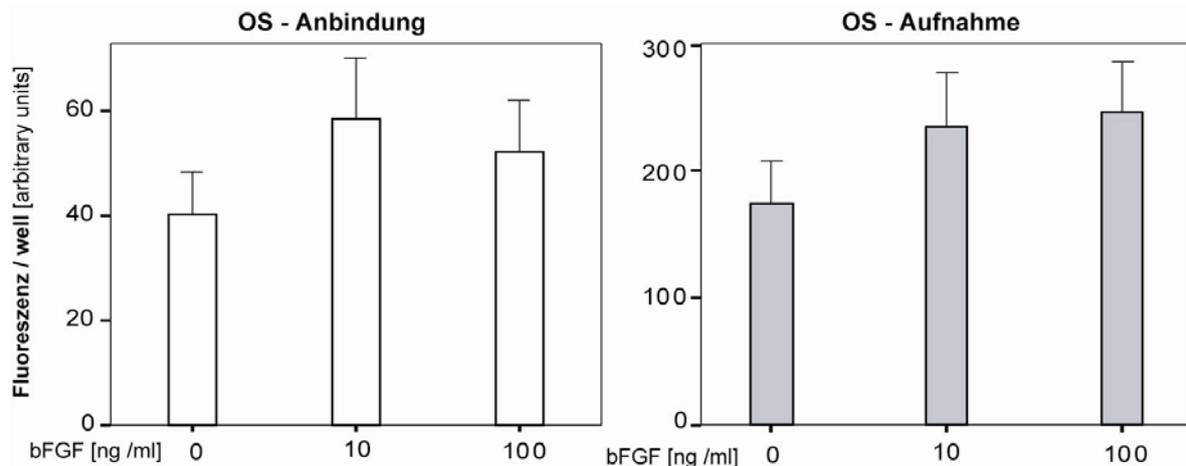


Abb. 3.47: bFGF Einfluss (24 h Vorinkubation) auf die Phagozytose (12 h) von RCS-RPE (n=1 x 8 Replikationen).

Die gezeigte bFGF Wirkung von 100 ng/ml nach 24 h Vorinkubation wurde durch Herbizimycin A auf  $117 \pm 11$  % der Aufnahme und  $132 \pm 15$  % der Anbindung nach 4 h OS Phagozytose reduziert (Abb. 3.48).

In dieser Arbeit wurde an gesunden humanen RPE Zellen ein inhibitorischer Effekt von bFGF auf die Phagozytose nach 1 h, aber nicht mehr nach 4 h beobachtet (Punkt 4.4.4).

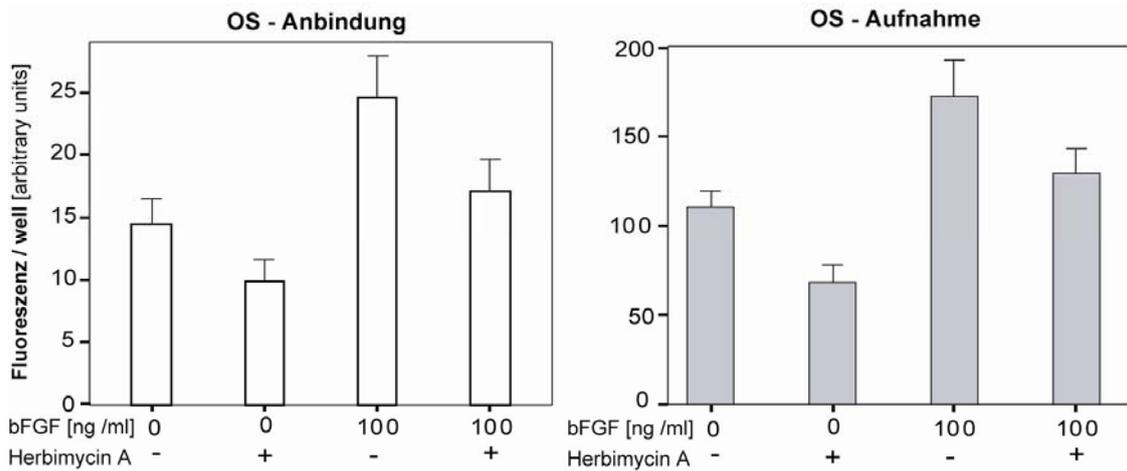


Abb. 3.48: bFGF Einfluss (24h Vorinkubation) mit /ohne HA auf die Phagozytose (4 h) von RCS-RPE (n=1 x 8 Replikationen).

Im Gegensatz dazu wurde nun erstmals an RCS-RPE Zellen eine Steigerung der RCS-RPE Phagozytose nach 30 min Vorinkubation mit 10 ng/ml bFGF (Abb. 3.49) erzielt. Die Aufnahme betrug  $169 \pm 9$  % SEM) und die Anbindung  $141 \pm 7$  % SEM. Eine Erhöhung der bFGF Konzentration auf 100 ng/ml bewirkte keine weitere Zunahme der Phagozytose (AF  $153 \pm 7$  % SEM, AB  $158 \pm 10$  % SEM).

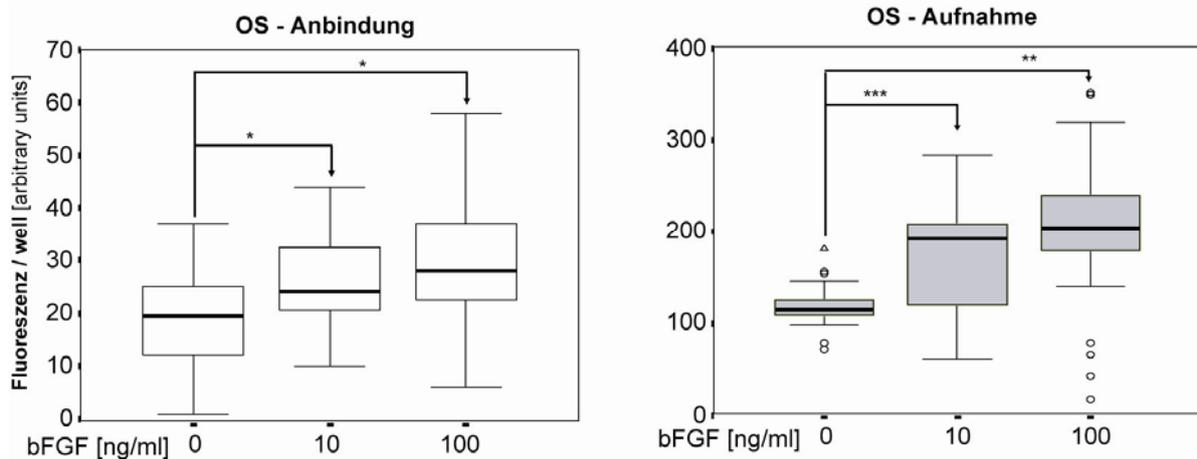


Abb. 3.49: Einfluss von bFGF (30 min Vorinkubation) auf die OS Phagozytose (4 h) von RCS-RPE Zellen (n=3).

#### 4.5.5. Zusammenfassung: Gegenüberstellung Kontroll-RPE und RCS-RPE

Tab. 3.2: Resümee: Phagozytoseexperimente an Kontroll-RPE Zellen (human und Ratte) versus RCS-RPE.

Phagozytose [ ± SEM %] (4 h)		Kontroll-RPE		RCS-RPE	
		Aufnahme	Anbindung	Aufnahme	Anbindung
FCS	Baseline	100 %	100 %	100 %	100 %
	+ 5 % FCS	↑ (SV) ↑↑↑ (PK)	↑ (SV)	↓↓	↑
	+ 10 % FCS	↑ (SV) ↑↑↑ (PK)	↑ (SV)	↓	↑
NIFEDIPIN	1 µM Nifedipin (30 min)	↓ (SV) ↓ (PK) ↓↓↓ (SV, 1 h, n=1)	↓ (SV)	↑↑↑	↑
	+ 5 % FCS	↑↑ (PK)		↑↑	↑
	2 µM Nifedipin	↓↓ (PK) ↓ (SV, 1 h; n=1)		↑↑↑	↑
	+ 5 % FCS			↑↑	↑
	5 µM Nifedipin	↓↓↓ (SV) ↓↓ (PK, 1 h; n=1)	↓ (SV)	↑↑↑ ↓ (12 h, n=1)	↑↑ ↓ (12 h, n=1)
+ 5 % FCS	↑↑↑ (SV)	↑ (SV)			
HERBIMYCIN A	Herbimycin A (12 h)	↓↓ (SV) ↓↓↓ (SV, 12h, n=1) ↓ (SV, 1 h, n=1) ↓↓↓ (PK) ↓ (PK, 1 h, n=1)	↔(SV) ↓ (SV, 12h, n=1)	↓↓↓ ↓ (12 h, n=1)	↓↓ ↓ (12 h, n=1)
	+ 5 % FCS	↑ (SV) ↑ (PK)	↑ (SV)	↓	↑
	+ 10 % FCS	↓ (SV)	↑↑ (SV)		
	+ 1 µM Nifedipin	↓↓↓ (SV) ↓↓↓ (SV, 12h, n=1) ↓ (SV, 1 h, n=1) ↓ (PK, 1 h, n=1)	↓↓↓ (SV) ↓ (SV, 12 h, n=1)		
bFGF	10 ng /ml bFGF (30 min)	↔(SV) ↓ (SV, 1 h) ↔(PK, 1 h, n=1)	↓↓ (SV)	↑↑↑ ↑↑↑ (24 h bFGF, n=1) ↑↑ (24 h bFGF, 12 t, n=1)	↑↑ ↑↑↑ (24 h bFGF, n=1) ↑↑ (24 h bFGF, 12 t, n=1)
	+ Herbimycin	↓ (SV, 1h, n=1) ↓↓ (PK, 1 h, n=1)			
	100 ng /ml bFGF (30 min)	↔(SV) ↓↓↓ (SV, 1 h)	↓↓ (SV)	↑↑↑ ↑ (24 h bFGF, n=1) ↑↑ (24 h bFGF, 12 t, n=1)	↑↑↑ ↑ (24 h bFGF, n=1) ↑↑ (24 h bFGF, 12 t, n=1)
	+ Herbimycin			↑ (n=1)	↑ (n=1)
ANTIKÖRPER (AK)	IgG-Ak (10 µg /ml)	100 %	100 %		
	Mer-Ak (10 µg /ml)	↓↓↓ (SV) ↓ (PK)	↓↓ (SV)		
	Gas6-Ak (10 µg /ml)	↓↓↓ (SV) ↓ (PK)	↓↓ (SV)		
	IgG-Ak + 5% FCS	100	100		
	Mer-Ak + 5% FCS	↓ (SV)	↓ (SV)		
Gas6-Ak +5% FCS	↓↓ (SV)	↔(SV)			

**LEGENDE:**  
SV = humanes SV40-RPE; PK = humanes primäres RPE; h = Stunden; min = Minuten; t = OS Inkubationszeit (k.A. =4 h);  
Werte > 100 %: ↑ < 125 %, ↑↑ < 150 %, ↑↑↑ < 200 %; ↑ ≥ 200 %;  
Werte < 100 %: ↓ > 80 %, ↓↓ > 70 %, ↓↓↓ > 60 %, ↓ ≤ 60 %  
kein Einfluss: ↔

## 5. Diskussion

### 5.1. Methode der Phagozytosemessung

#### 5.1.1. Zytofluorometrie-technik

**D**ie verschiedensten Techniken zur Messung der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) durch retinale Pigmentepithelzellen (RPE) stehen zur Verfügung. Dabei basieren die meisten Methoden der OS Detektion auf der Fluoreszenzfärbung. Zur Quantifizierung der Phagozytose wurden Durchflusszytometriemessung (Kennedy, et al. 1996, Miceli, et al. 1994), manuelles Zählen im Lichtmikroskop (Edwards, et al. 1977, Hall, et al. 1996a, Heth, et al. 1991b, Lin, et al. 1998, McLaren, et al. 1993, Ryeom, et al. 1996b), Radioimmunoassays (Edwards, et al. 1977, Gregory, et al. 1991, Kennedy, et al. 1994, Ryeom, et al. 1996b) oder Zytofluorometrie (Finnemann, et al. 1997a, Mannerstrom, et al. 2001) verwendet. Obwohl viele sehr gute Methoden in der Literatur zur Verfügung standen, konnte keine alleinig die von mir aufgestellten Kriterien erfüllen: Messung von Anbindung und Aufnahme in einem Messsystem, hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, parallelen Wiederholungen und hoher Probendurchsatz.

Mit Hilfe der von mir erweiterten Methode zur Messung der Phagozytose von OS durch RPE Zellen konnten erstmals Anbindungs- und Aufnahmephase der Phagozytose in einem Messverfahren quantifiziert werden.

Da bisher die Anbindung entweder gar nicht oder meist in einem zweiten Schritt manuell lichtmikroskopisch quantifiziert wurde, bietet die optimierte Technik eine Zeitersparnis. Außerdem wurde ein hoher Probendurchsatz ermöglicht. Dabei konnten mittels 96-Lochzellkulturplatten bis zu zwölf Variablen mit acht Replikationen pro Durchlauf gemessen werden. Dadurch sanken im Vergleich zu anderen Techniken der Materialverbrauch und vor allem der Verbrauch an OS. Da gerade die Herstellung der OS Zeit in Anspruch nahm, wurde sukzessiv auch der Arbeitsaufwand reduziert. Mit der Vereinfachung der notwendigen Arbeitsschritte und Reduktion des Zeitaufwands konnte aufgrund der acht Wiederholungen eine hohe Reproduzierbarkeit der Messergebnisse erreicht werden. Eine Ausfallsicherheit bei Zellverlust durch die Waschungen der Zellkulturen wurde somit ebenfalls auch erwirkt. Letztlich sei noch erwähnt, dass die Bedienfreundlichkeit im Vergleich zur Messung mittels Durchflusszytometrie besser ist. Der Vorteil letzterer Technik ist die genauere Analyse der Aufnahme (keine Detektion der Anbindung) pro Zelle und erlaubt damit die Beobachtung unterschiedlicher Zellpopulationen innerhalb einer Messung. Weiterhin konnte auch im Rahmen dieser Arbeit die höhere Auflösung der Durchflusszytometrie gerade nach der kurzen OS Inkubation von einer Stunde genutzt werden. Denn mit der Zytofluorometrie konnten zu einem so frühen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede aufgelöst werden.

In dieser Arbeit wurde aus diversen Gründen auch permanente RPE Zellen verwendet. Prinzipiell erlauben permanente Zellkulturen den Gebrauch morphologisch homogener Zellen in hoher Zellzahl, bei gleichmäßiger Zellproliferation und Elimination von Variabilitäten bedingt durch Zellspender und Zellsubtypen (McKay, et al. 1994). Im Umkehrschluss muss an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die an permanenten Zelllinien erhobenen Ergebnisse in ihrer Aussagekraft begrenzt sind. Denn Zellen, welche in vitro permanent proliferieren, müssen nicht inhärente Funktionen und Eigenschaften differenzierter Zellen aufweisen. Daher wurde die in dieser Arbeit verwendete permanente

Zelllinie zuerst hinsichtlich der Phagozytose im Vergleich zur Literatur charakterisiert. Dann erst wurden neue Daten erarbeitet, die anschließend in den jeweiligen Fällen an primären RPE noch verifiziert wurden. Die *in vitro* Untersuchung RPE spezifischer Eigenschaften an primärer RPE Zellkulturen ist limitiert durch die geringe Verfügbarkeit von humanem Spendermaterial. Die Wahrscheinlichkeit des Verlustes oder der Veränderung gewebsspezifische Charakteristika ist auch bei primären RPE Zellkulturen gegeben, wenn sie nicht möglichst frühzeitig nach der Überführung in die Zellkultur verwendet wurden (Feng, et al. 2003, Nabi, et al. 1993). Daher müssen letztendlich alle *in vitro* gewonnen Daten noch durch weitere Experimente *in vivo* überprüft werden. SV40 transfizierte RPE Zellen wurden schon mehrfach in Studien verwendet (Kato, et al. 1996, Nabi, et al. 1993, Sippy, et al. 1995). Es gibt eine RPE Zelllinie aus der Ratte, welche auch für Phagozytosestudien als Modell diente (Feng, et al. 2002, Finnemann, et al. 1997a, Finnemann, et al. 1997b, Finnemann, et al. 1999, Finnemann, et al. 2001, Finnemann 2003a, 2004b, Hall, et al. 2003a, Nabi, et al. 1993).

Zur Verifizierung der neuen Methode wurden zwei Wege gewählt. Zum einen wurden Zellen erst mit der erweiterten Methode gemessen und dann verifiziert mittels Durchflusszytometrie. Zum anderen wurde die Phagozytose der SV40-RPE Zelllinie, welche bis dahin noch nicht charakterisiert war, wie folgt untersucht. Der Beweis der OS Spezifität, der OS Sättigung, der spezifischen Serumstimulierbarkeit und der Kinetik der Phagozytose konnte erbracht werden (siehe nächster Abschnitt). Somit wurden die Zelllinie und damit auch die erweiterte Messtechnik validiert.

Die Verwendung von kryokonservierten OS ist eine gängige Methode (Finnemann, et al. 1997a, Lin, et al. 1998). Die OS nach Kryokonservierung wiesen noch intakte OS auf. Die Verwendung frisch gewonnener OS enthalten wahrscheinlich mehr vollständig intakte OS. In einer früheren Untersuchung wurde diskutiert, ob kleinere Fragmente zu einer schnelleren OS Degradierung im RPE führen (Goldman, et al. 1979). Desweiteren gibt es Hypothesen zu einem Verlust in der Anstiegsgeschwindigkeit in der ersten Stunde der Phagozytose *in vitro* (Hall, et al. 2003a), jedoch ist die Größenordnung als auch die Übertragbarkeit auf humanes Gewebe noch nicht geklärt.

Die OS stellen wahrscheinlich den physiologischen Reiz der Phagozytose am RPE dar und erlauben am ehesten Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation. Weiterhin stellt die Phagozytose von RPE Zellen einen Multirezeptorvorgang dar, bei dem wichtige Liganden mit oder auf der OS Oberfläche reagieren. Eine Standardisierung der Quantifikation durch Erstellung einer OS Standardkurve für jede Messung stellte sich prinzipiell als zu komplex heraus. Eine variierende Partikelgröße in den OS Präparationen von einzelnen, bis hin zu kompletten OS, ist anzunehmen. Diese Bandbreite an Partikelgrößen, der mögliche Unterschied der Fluoreszenzmarkierung dieser einzelnen Partikelgrößen und der mögliche Fluoreszenzmessunterschied von aufgenommen OS zu reinen OS, machte die Erstellung einer Standardkurve und damit die Berechnung der Anzahl aufgenommener und angebundener OS hier unmöglich. Grundsätzlich sollten zwei wichtige Faktoren bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden. Erstens werden bei der Phagozytose *in vivo* nicht ganze OS aufgenommen, sondern nur kleinere Abschnürungen. Zweitens, findet der Versuch unter artifiziellen Bedingungen in Zellkultur statt und RPE Zellen können *in vitro* ihren Phänotyp verändern. Und zusätzlich sollten Ergebnisse, die nur an einer RPE Zelllinie erhoben wurden noch kritischer betrachtet werden, da diese Zellen einer permanenten Proliferation bei fehlender Kontaktinhibition unterliegen. Daher wurden die an SV40-RPE evaluierten Versuche hier weitgehend in an humanen RPE Primärkulturen verifiziert.

### 5.1.2. OS Konkurrenztest

In Konkurrenzexperimenten wurde die Spezifität der Phagozytose für OS untersucht. Der Nachweis, dass markierte und unmarkierte OS miteinander in den entsprechenden Verhältnissen konkurrieren konnte für die hier verwendeten SV40-RPE Zellen erbracht werden. Die in der Literatur gut charakterisierte Eigenschaft (Edwards, et al. 1986, Edwards 1991, Hall, et al. 1987, Kennedy, et al. 1994, Kennedy, et al. 1996, Mayerson, et al. 1986, Miceli, et al. 1994, Reid, et al. 1992), dass ein OS spezifischer Rezeptorenprozess vorhanden ist, konnte auch für humanes SV40-RPE erbracht werden. Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch porcine OS von humanem RPE spezifisch erkannt werden. Das wiederum bestätigt erstmalig die Validität hinsichtlich der spezifischen OS Phagozytose einer SV40 transfizierten humanen RPE Zelllinie für weitere Untersuchungen. Und letztendlich wurden durch den OS Konkurrenztest die Zuverlässigkeit der erarbeiteten Methode der Phagozytosemessung bewiesen. Denn nur OS, welche durch die Fluoreszenzfärbung nicht einschneidend verändert wurden, konkurrierten adäquat mit nativen OS.

## 5.2. Charakterisierung der Phagozytose durch SV40-RPE

Eine humane SV40 transfizierte RPE Zelllinie wurde erstmals bezüglich ihrer Phagozytosecharakteristik in dieser Arbeit untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass hinsichtlich OS Aufnahmekapazität, Kinetik und der spezifischen Stimulierbarkeit durch Serum eine sehr gute Korrelation zu anderen transformierten und transfizierten RPE Zelllinien besteht, wie die folgende Diskussion zeigt.

### 5.2.1. Einfluss der OS – Menge

Die OS Phagozytose der SV40-RPE Zellen zeigte eine OS Konzentrationsabhängigkeit. Dabei wurde eine Sättigung der Anbindung zu einem früheren Zeitpunkt als dem der Aufnahme beobachtet. Im Vergleich zu Daten in der Literatur ergibt sich im Folgenden beschriebenes Bild.

Tab. 4.1: Vergleich der OS Sättigungskonzentration mit Daten aus der Literatur.

OS /cm <sup>2</sup>	OS /ml	ml	Loch	cm <sup>2</sup>	OS	RPE	FCS	Literatur
1.43 x 10 <sup>7</sup>	5.0 x 10 <sup>7</sup>	0.1	96	0.35	porcine	SV40-RPE	5 %	Daten aus dieser Arbeit
1.18 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	3.0	12	3.80	bovine	human (P1-3)	5 %	(Miceli, et al. 1994)
0.79 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	1.0	24	1.90	bovine	human (P3-4)	10 %	(Kennedy, et al. 1996)
0.53 x 10 <sup>7</sup>	1.5 x 10 <sup>7</sup>	2.5	Filter	7.07	bovine	human (P0-1)	10 %	(Kennedy, et al. 1994)
0.53 x 10 <sup>7</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>	1.0	24	1.90	rat	rat (P0)	10 %	(Reid, et al. 1992)
0.53 x 10 <sup>7</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>	1.0	24	1.90	bovine	bovine (P0)	10 %	(Reid, et al. 1992)
0.24 x 10 <sup>7</sup>	0.5 x 10 <sup>7</sup>	2.0	Deckglas	3.80	rat	rat (P0)	20 %	(Hall, et al. 1987)

Die Sättigung der Phagozytose humaner RPE Zellen in Primärkultur bis dritter Passage (Miceli, et al. 1994) durch bovine OS war vergleichbar mit unseren Beobachtungen mit porcine OS an SV40-RPE Zellen (Tab. 4.1). Beim Vergleich zu Untersuchungen an kultivierten humanen RPE in Primärkultur bis Passage 4 (Kennedy, et al. 1994, Kennedy, et al. 1996) und der Phagozytose von bovinen oder Ratten OS war für die Sättigung der OS Aufnahme durch SV40-RPE eine größere Menge porciner OS notwendig. Dabei wurde aber jeweils mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen gearbeitet. Insgesamt sind die in Tab. 4.1 aufgeführten Beobachtungen vergleichbar. Es muss jedoch beachtet werden, dass für Abweichungen in Zellzahlen pro Fläche, Kultur- sowie Medienbedingungen und Spe-

ziendifferenzen nicht korrigiert wurde. Die Daten suggerieren einen Einfluss der Serumkonzentration auf die OS Sättigung.

Zusammenfassend war die OS Sättigung der Phagozytose in dieser Arbeit vergleichbar mit den Literaturwerten. Aufgrund der bisherigen Datenlagen kann keine klare Aussage auf die vielerorts diskutierten Unterschiede der OS Sättigung in Bezug auf die Speziesherkunft der OS und der RPE Zellen getroffen werden. Dabei erscheint ein reziproker Zusammenhang von der verwendeten Serumkonzentration auf die OS Sättigungskonzentration als möglich.

### **5.2.2. Kinetik der OS Phagozytose**

In vivo unterliegt die Phagozytose der OS einem zirkadianen 12 Stunden Hell- und Dunkelrhythmus. Dabei kommt es zu einer massiven Phagozytose von 30 bis 150 min Dauer nach ein bis zwei Stunden nach dem Übergang von der Dunkel- zur Hellsituation (Herman, et al. 1982, LaVail 1976b, 1980). Es wurde beobachtet, dass dieser initiale Anstieg in der Phagozytose zu jeder Tageszeit auch in vitro reproduziert werden konnte. Diese Beobachtung wurde zuerst bei in vitro überführten Organkulturen sowie RPE Explantaten gemacht (Tamai, et al. 1979, Tamai, et al. 1982). Wenig später wurde dies auch an RPE Zellkulturen (Chaitin, et al. 1983b, Edwards, et al. 1977, Hall 1978) gezeigt. Weiterhin wurde dann die in vitro OS Phagozytose auch über längere Zeiträume von 24 Stunden verfolgt. Das Studium der Anbindung folgte zeitlich wenig später. Es zeigte sich in vielen Studien eine vergleichbare Kinetik. Auch die an den SV40-RPE gewonnenen Daten sind mit diesen Literaturwerten vergleichbar. In der Literatur war die größte Zunahme der Aufnahme in den ersten zwei bis sechs Stunden je nach Spezies (Boulton, et al. 1984, Hall, et al. 1987, McLaren, et al. 1993, Reid, et al. 1992) und den ersten 4 bis 6 Stunden an humanen RPE in Passage 1 bis 3 (Miceli, et al. 1994) zu beobachten. Eine darauf folgende Phase von ungefähr 4 bis 8 Stunden mit geringerer Zunahme der Aufnahme wurde ebenfalls beschrieben, die scheinbar nicht durch zunehmenden OS Verdau erklärt werden kann (Reid, et al. 1992). Weiterhin korrelierten die Ergebnisse mit dem SV40-RPE sehr gut mit den Daten, die an der spontan transformierten humanen D407 RPE Zelllinie erhoben wurden (Kennedy, et al. 1996) sowie an primären Ratten RPE (Hall, et al. 1987).

### **5.2.3. Einfluss von fetalen Kälberserum**

Die SV40-RPE Zellen zeigten unter Serumzugabe eine Zunahme der OS Aufnahme, wie schon mehrfach für humanes RPE und anderer Spezies beschrieben wurde (Tab. 4.2). Dies war die erste genauere Analyse einer SV40 transfizierten humanen RPE Zelllinie. Bei zunehmender Serumkonzentration zeigte sich eine geringe Zunahme der OS Anbindung ab 1 % FCS und eine Sättigung ab 2,5 %. Vor allem wurde jedoch die OS Aufnahme stimuliert. Dieses wurde ebenfalls ab 1 % FCS beobachtet, aber die Sättigung trat erst bei 10 % auf. Die ermittelten Werte sind mit Daten an humanem RPE bei 5 % FCS in der Literatur vergleichbar (Miceli, et al. 1994). Der Serumeffekt an humanen RPE Zellen (Miceli, et al. 1994, Miceli, et al. 1997b) und an humanen SV40-RPE Zellen war eher geringer als der Effekt an Ratten-RPE (Edwards, et al. 1986, Edwards 1991, Hall, et al. 2001, Mayerson, et al. 1986). Mögliche Gründe für diese Beobachtung könnten in den unterschiedlichen Inkubationszeiten, der verschiedenen Serumherkunft, den Speziesunterschieden von RPE oder OS, den unterschiedlichen RPE Zellsubtypen (McLaren 1996), der unterschiedlichen OS Aufbereitung (Hall, et al. 2003a) und den diversen Zellkulturbedingungen (z.B. Zellaussaatdichte oder siehe auch Einfluss von Zellkulturmedienbedingungen auf die Phagozytose Kapitel 5.4) liegen.

Tab. 4.2: Literaturvergleich des Serumeinflusses auf die OS Phagozytose des RPE.

Serum [%]	Phago Zeit	Aufnahme -steigerung	RPE / OS Quelle	Literatur
1 2.5 5 10 15	4 h	1 bis 2.5 fach 1.5 bis 3 fach 1.5 bis 3 fach 2 bis 6 fach 2 bis 4 fach	SV40-RPE / porcine	Daten aus dieser Arbeit
5	4 h	1.5 bis 3 fach	human P1-3 / bovine	(Miceli, et al. 1997b)
5	4 h	3 bis 7 fach	human P1-3 / bovine	(Miceli, et al. 1994)
1 10	1 h	0.8 bis 1.4 4 bis 5 fach	Ratte P1 / Ratte	(Hall, et al. 2001)
2	1 h	1.5 bis 2 fach	Ratte P0 / Ratte	(Edwards 1991)
0.5 1.25 2.5 5 10 20	3 h	2 bis 3 fach 5 bis 8 fach 7 bis 10 fach 8 bis 13 fach 9 bis 11 fach 9 bis 10	Ratte P1 / Ratte	(Mayerson, et al. 1986)
2 10 20	1 h	1.3 fach 3 bis 13 fach 3 bis 13 fach	Ratte P0 / Ratte	(Edwards, et al. 1986)

### 5.3. Phagozytose und Tissue Engineering

Das Vorhaben Zellkulturmedien und verschiedene ausgewählte Supplemente zu untersuchen war aus unterschiedlichen Gründen von Interesse. In der Literatur besteht keine einheitlich verwendete Technik der RPE Zellkultivierung. Daher sind die Grundvoraussetzungen im Sinne der Zellkultur bei Zellfunktionsexperimenten, wie der Phagozytose, meist unterschiedlich und gegebenenfalls nur bedingt vergleichbar. Es ist bisher nicht geklärt, welchen Effekt die Zellkulturbedingungen auf die Zellfunktionen haben können. Das Verständnis und die Kontrolle über den Erhalt und /oder die Entwicklung zell-eigener Charakteristika ist von besonderem Interesse für das Tissue Engineering.

In der Literatur finden sich wie später diskutiert einige Studien zum Einfluss von Zellkulturbedingungen auf morphologische Eigenschaften oder Proteinexpression der RPE Zellen, aber nur wenige im Zusammenhang mit zellulären Funktionen. Diese „in vitro Differenzierung“<sup>4</sup> ist in vielerlei Hinsicht von Interesse. Das ultimative Ziel liegt in der Entwicklung definierter Zellkulturbedingungen, welche die Proliferation und /oder die „in vitro Differenzierung“, kontrolliert ermöglichen. Die Vorstellungen dabei sind, dass diese Bedingungen der in vivo Umgebung der Zellen bestmöglich entsprechen.

#### 5.3.1. Serumfreie Medien

SERUMFREIE ZELLKULTIVIERUNG ist eine elementare Komponente der Transplantatentwicklung, aber spielt auch zunehmend eine wichtige Rolle bei jeglichen zellbiologischen und –physiologischen Unter-

<sup>4</sup> Die Differenzierung bezeichnet in der Biologie das Verschiedenwerden von Zellen oder biologischen Strukturen während der Individualentwicklung (Ontogenese). Die „in vitro Differenzierung“ ist ein umstrittener Terminus, der vor allem im Tissue engineering zum Tragen kommt. Er beschreibt den Erhalt, und /oder die Wiederherstellung, sowie bei Stammzellen auch die Neuausbildung, zellspezifischer Merkmale (Struktur, Funktion, Polarität, Proteinexpression, etc.) in vitro.

suchungen. Denn nur die Gewebszucht in definierten Bedingungen ermöglicht die Kontrolle und damit Steuerung zelleigener Charakteristika in Kultur.

Die serumfreie RPE Kultivierung, der Zellerhalt und die Proliferation *in vitro* sind erst seit kurzer Zeit möglich (Doubilei, et al. 2002, Oka, et al. 1984, Tezel, et al. 1998). Seit diesen jüngsten Fortschritten, die auch die serumfreie RPE Zellkultur unter Erhalt wichtiger *in vivo* Charakteristika eröffnet, sind die hier dargestellten Untersuchungen eine neue Basis um Zellkulturmedienkompositionen zu untersuchen. Die Qualität und der Erhalt RPE spezifischer Zellfunktionen, wie der Phagozytose, wurden in gängige RPE Zellkulturmedien unter serumfreien Bedingungen quantifiziert.

Hier wurde der Einfluss auf die Phagozytose von folgenden Medien quantifiziert: F99 (Engelmann, et al. 2004), DMEM (Dulbecco, et al. 1959), MEM (Eagle 1959), SFM und hSFM (Battista, et al. 1994). Es zeigte sich, dass Unterschiede in der Zusammensetzung von Zellkulturmedien die Phagozytoseleistung beeinflussen.

Die speziell für serumfreie Zellkultur definierten Medien SFM und hSFM waren für die Phagozytose förderlich. Leider sind die Zusammensetzungen der serumfreien Zellkulturmedien nicht veröffentlicht, sondern patentgeschützt durch die Firma Invitrogen. Somit war hier kein detaillierter Vergleich möglich. SFM und hSFM könnten in Zukunft sich für RPE Experimente unter serumfreien Bedingungen als günstig erweisen. Denn es fördert nicht nur wie hier gezeigt die Phagozytose, sondern erlaubt auch die Proliferation sowie den Erhalt RPE differenzierter Funktionen, wie die Expression von Zellverbindungsproteinen wie ZO1 sowie die Expression von Zytokeratin 8, 18 und 19 bei typischer epithelialer polygonaler Morphologie *in vitro*. Desweiteren erlaubt es die Ausbildung von Mikrovilli und eine Melanogenese *in vitro* (Doubilei, et al. 2002). Somit wären serumfreie Zellkulturmedien verfügbar, die durch entfallende Serumzugabe keine Chargenunterschiede verursachen.

Die in der Literatur gängigsten RPE Zellkulturmedien MEM und DMEM fanden sich im Mittelfeld der untersuchten Medien. Die Medien Ham's F12 und Medium 199 wurden ebenfalls schon vielfach für RPE Zellen *in vitro* verwendet.

Das Medium F99 ist eine 1:1 Mischung aus beiden, reichhaltiger an Einzelkomponenten als MEM und DMEM (siehe Tab. im Anhang 8.3), wurde ebenfalls schon mehrfach in der Literatur verwendet (Engelmann, et al. 2004, Hecquet, et al. 2002a, 2002b, 2003, Valtink, et al. 1999a, Valtink, et al. 1999b, Ventura, et al. 1996) und erwies sich als besonders förderlich für die RPE Zellvermehrung *in vitro* und den Erhalt nach Zellkryokonservierung (Engelmann, et al. 2004, Valtink, et al. 1999b, Ventura, et al. 1996). Die Phagozytoseleistung von RPE Zellen kultiviert in F99 stellte sich geringfügig kleiner aber signifikant im Vergleich zu MEM, DMEM, SFM und hSFM dar.

Wie aus der Tabelle im Anhang 8.3 entnommen werden kann, unterscheiden sich MEM und D-MEM nur geringfügig, F99 aber ist sehr unterschiedlich. Grundsätzlich enthält F99 viel mehr zusätzliche Supplemente. Darunter Spurenelemente, zusätzliche Energiequellen, zusätzliche Puffer (Miceli, et al. 1996), einige Aminosäuren und Vitamine, die alle potentiell die Phagozytose beeinflussen können. Andererseits sind wiederum einige der Komponenten, welche auch in MEM und D-MEM vorkommen, in F99 in einer viel geringeren Konzentration vorhanden.

Dabei unterscheiden sich MEM und D-MEM in nur wenigen Komponenten. Natriumpyruvat und einige Aminosäuren sind doppelt so hoch konzentriert in D-MEM als in MEM. Ob eine vierfach höhere Glukosekonzentration in D-MEM die Phagozytose eher fördern oder reduzieren könnte ist umstritten (Del

Monte, et al. 1991, Miceli, et al. 1994, Senda, et al. 1967). Bei weiterer genauerer Analyse der Komponenten wurden einige identifiziert, welche eine geringere Phagozytoseleistung erklären könnten. F99 enthält nur halb so viel  $\text{Ca}^{2+}$  wie MEM und D-MEM und  $\text{Ca}^{2+}$  Erniedrigung reduziert die Phagozytose (Hall, et al. 2002).

Ob eine tausendfach geringere Glukosekonzentration in F99 als in D-MEM eher für eine geringere (Miceli, et al. 1994, Senda, et al. 1967) oder erhöhte (Del Monte, et al. 1991) Phagozytoseleistung spricht ist noch unklar. Deoxyribose als zusätzlicher Zucker im F99 könnte das ausgleichen oder für die Reduktion verantwortlich sein (Boxer, et al. 1977), da möglicherweise nicht alle Zucker die Phagozytose gleichermaßen beeinflussen (Heath, et al. 1983).

Ebenfalls sind Komponenten im F99 enthalten, die die Phagozytose inhibieren. Dazu zählen ATP (Mitchell 2001), Ascorbat (Blanks, et al. 1992), Zink (Miceli, et al. 1994) und gegebenenfalls auch Linolensäure (Ikemoto, et al. 2000). Andererseits enthält F99 auch einige wenige bekannte die Phagozytose fördernde Supplemente, die nicht in MEM und D-MEM enthalten sind. Dazu zählen Vitamin A (Katz, et al. 1987, Yang, et al. 1978) und zusätzliche Antioxidantien (Akeo, et al. 2002, Becquet, et al. 1994). In F99 sind viel mehr verschiedene Aminosäuren. Und obwohl nur F99 auch exzitatorische Aminosäuren enthält, die gegebenenfalls die Phagozytose stimulieren, enthalten MEM und D-MEM mengenmäßig viel mehr Aminosäuren, was die Phagozytose gegebenenfalls fördert (Fragoso, et al. 1999, Lopez-Colome, et al. 1993, Lopez-Colome, et al. 1994).

### 5.3.2. Serumsupplementierte Medien

FETALES KÄLBERSERUM (FCS) ist in der Zellkultur noch ein gängiges und notwendiges Supplement zum Erhalt von Vitalität und zur Proliferation der Zellen. Beim Medienvergleich unter Serumzugabe zeigte sich ein interessantes Ergebnis hinsichtlich der Phagozytoseleistung.

RPE Zellen in SFM Medium zeigten unter serumfreien Bedingungen mit die höchste Phagozytoseleistung und unter F99 eine geringere. Unter Serumsupplementierung erwies sich dennoch F99 als vorteilhaft. Grundsätzlich wäre anzunehmen, das Serum in beiden Fällen gleichermaßen die Phagozytose stimuliert. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die beiden Serumproteine, Protein S und in geringerer Menge Gas6, dafür verantwortlich sind (Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2003b, Hall, et al. 2005). Dennoch scheinen andere Faktoren, die wie unter 5.4.1 diskutiert die Phagozytose selbst beeinflussen, diesen Einfluss zusätzlich modulieren.

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass noch wenig über die Wirkungen der Einzelkomponenten von Zellkulturmedien bekannt ist. Die Zusammensetzung gängiger Basalmedien können die Phagozytose von RPE Zellen, wenn auch nur geringfügig, modulieren. Wie sich hier zeigte, bestehen ein Einfluss der Basalmedienkomponenten auch unter maximaler Serumstimulation der Phagozytose und das zusätzlich mit veränderter Qualität.

### 5.3.3. Chorioidea konditioniertes Medium

CHOROIDEA KONDITIONIERTES MEDIUM (ChCM) stellt ein komplexes Supplement dar, dessen genaue Zusammensetzung nicht bekannt ist. Es beinhaltet trophische Faktoren aus der Chorioidea, welche die Proliferation bei 15 % ChCM maximal fördern (Ventura, et al. 1996) und die Expression RPE spezifischer Proteine in vitro beeinflusst (Engelmann, et al. 2004, Valtink, et al. 1999a, Valtink, et al. 1999b).

Hier wurde nun erstmals der ChCM Einfluss auf eine Zellfunktion, die OS Phagozytose von RPE Zellen, studiert (Valtink, et al. 2002). Es wurde eine konzentrationsabhängige Reduktion beider Phagozytosephasen ermittelt. Eine ChCM Konzentration von 5 bis 15 % war inhibierend. In einer vorherigen Studie zeigte eine ChCM enthaltende Medienkomposition, basierend auf Medium F99, einen förderlichen Effekt auf die Kalziumkanalexpression an humanem RPE in vitro (Valtink, et al. 1999b).

Ein Interesse am Studium des ChCM Einflusses auf das RPE in vitro basiert auf der Hypothese, dass die Sekretion diverser Signalstoffe von Nachbarzellen einen wichtigen stabilisierenden Einfluss auf zellimmanente Charakteristika haben. Es besteht die Vorstellung, dass man unter Verwendung dieses komplexen Supplementes in der Zellkultur den Einfluss auf Zellmorphologie, Proteinexpression und Zellfunktionen nutzen kann, um nach Entschlüsselung der Zusammensetzung von ChCM wichtige Hinweise für die Herstellung von vollständig definierten Medien zu erhalten. An ziliaren Ganglienzellneuronen stimulierte ChCM die Expression von Somatostatin (Coulombe, et al. 1991). Dabei konnte gezeigt werden, dass womöglich Activin, ein Differenzierungsfaktor, im ChCM dafür verantwortlich war (Coulombe, et al. 1993). RPE Zellen exprimieren Activin, dessen Rezeptoren und reagieren mit Migration auf Activinapplikation (Jaffe, et al. 1994, Mitsuhiro, et al. 2003, Obata, et al. 1999). RPE Zellen weisen funktionelle Somatostatinrezeptoren auf (Kishi, et al. 1996, Klisovic, et al. 2001, Sall, et al. 2004, Vasilaki, et al. 2004). Somatostatin wiederum konnte die Phagozytose durch verschiedenen Phagozyten stimulieren oder inhibieren (Ahmed, et al. 2001, Cornell, et al. 1982).

Eine weiterhin hoch interessante Hypothese wird durch den hier gezeigten negativen Einfluss von ChCM auf die Phagozytose von RPE Zellen aufgeworfen. Frühe Veränderungen bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) stellen Brüche und Lücken in der Bruchmembran dar (Heriot, et al. 1984, van der Schaft, et al. 1993). Später können sich choroidale Neovaskularisation bilden und die RPE Barriere schädigen (Zarbin 1998).

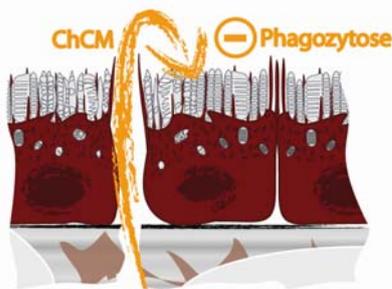


Abb. 4.1:

Die Choroida mit den choroidalen Gefäßen, Melanozyten und Stromazellen liegt basal der RPE Zellen und somit vor der Blut-Retina Schranke. Prozesse die zum Verlust dieser Schranke führen, wie sie zum Beispiel im Rahmen der altersabhängigen Makuladegeneration auftreten, würden die Passage trophischer und toxischer Substanzen aus dem choroidalen Gebiet in den subretinalen Raum zulassen. Ein Choroida konditioniertes Medium inhibiert die Phagozytose in vitro.

In allen Fällen wird ein neuer pathologischer Kontakt zwischen Choroida, RPE und subretinalem Raum ermöglicht. Es gibt umfangreiche Hinweise darauf, dass Veränderungen der Phagozytoseleistung und /oder dem Abbau von Phagosomen wiederum zu metabolischen Beeinträchtigungen der Zellen führen (Gal, et al. 2000, Sun, et al. 2001, Vollrath, et al. 2001). Das hat dramatischen Konsequenzen für die Photorezeptoren, deren Überleben vom gesunden RPE abhängt. Zum Beispiel könnte eine verlangsamte Phagozytose zur vermehrten Oxidierung von Photorezeptorenlipidanteilen schon vor Bindung und Aufnahme führen. Das lysosomale System des RPE könnte möglicherweise unfähig sein diese oxidierten Photorezeptorpartikel effektiv abzubauen (Becquet, et al. 1994, Finnemann, et al. 2002), was zum Teil durch eine gestörte Fusion von Lysosomen mit Phagosomen bedingt sein

könnte (Hoppe, et al. 2001). Andererseits könnte die in der Spätphase der AMD entstehende chorioidale Neovaskularisation mit einem erhöhten Spiegel an Activin einhergehen. Activin fördert die Angiogenese durch Stimulation der VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) Sekretion (Poulaki, et al. 2004) und mindert als Bestandteil des ChCM wie hier gezeigt möglicherweise die Phagozytoseleistung (Abb. 4.1). Die zur altersabhängigen Makuladegeneration beitragenden Mechanismen sind multifaktoriell, komplex und unvollständig verstanden (Bird 1996, Zarbin 1998).

#### 5.3.4. Retinaextrakt

RETINAEKTRAKT (RE) ist ein Zellkulturmedienzusatz, der 1990 erstmals als förderlich für eine RPE „in vitro Differenzierung“ beschrieben wurde (Pfeffer 1990). Seitdem konnten diese Beobachtungen durch weitere Studien gestützt (Hu, et al. 2001), sowie ein stimulierender Einfluss auf das in vitro Proliferationsverhalten ermittelt werden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Engelmann).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Verwendung von 1 % RE die Phagozytose fördert. Höhere Konzentrationen hingegen reduzierten die Phagozytose. RE wurde mit 1 % Supplementierung für eine Mediumkomposition beschrieben, die den Erhalt von RPE Zellcharakteristika in Kultur begünstigt (Hu, et al. 2001). Ein RE Einfluss wurde bisher vor allem hinsichtlich Morphologie, Proteinexpression und Polarität untersucht.

Hier konnte nun auch gezeigt werden, dass die Phagozytose nicht nur erhalten sondern auch stimuliert wird. Somit kann ein komplexes Supplement, je nach zugegebener Konzentration, unterschiedliche Wirkungen auf Zellfunktionen haben. Gerade komplexe Zusätze mit unterschiedlichen konzentrationsbedingten Wirkungen eignen sich zur weiteren Inhaltsstoffanalyse und –subtraktion.

Das Retinaextrakt als ein Produkt der Retina enthält die Phagozytose stimulierende Komponenten, welche wie hier getestet bei einer Konzentration von 1 % RE zum Tragen kommen. Bei einer Konzentration von 5 und 10 % hat RE einen inhibierenden Effekt. Diese Effekte könnten sich durch das Vorhandensein ein oder mehrerer verschiedener natürlicher Rezeptorliganden der Phagozytoseregulation im RE erklären. Die Phagozytose wird so möglicherweise durch RE Zugabe stimuliert und ab einer gewissen Konzentration kommt es zur kompetitiven Inhibition oder dem Überwiegen von Inhibitoren.

Diese konträren Einflüsse könnten bei Retinazelluntergängen theoretisch auch in vivo entstehen und somit den pathologischen Verlauf beeinflussen. Folglich könnte in der Pathogenese die Phagozytose stimuliert werden, um dem mehr an Debris gerecht werden. Die Pathogenese könnte sich aber auch eigenständig potenzieren, indem die Phagozytoseleistung reduziert wird, damit sich der Debrisanfall vergrößert und letztlich auch der Zelluntergang zunimmt (Abb. 4.2). Diese Hypothese ist auch von besonderem Interesse für die Zellgewebersatztherapie bei Retinadegenerationen basierend auf funktionsdefizientem RPE. Denn bei einer Transplantation von gesunden RPE würde gegebenenfalls auch die Phagozytose der eigentlich funktionsfähigen Transplantatzellen beeinträchtigen werden.

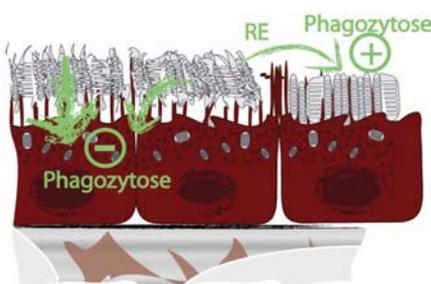


Abb. 4.2: Die Retina ist die apikale Nachbarstruktur des RPE. Ein Zelluntergang der Retina im Rahmen einer retinalen Degeneration führt zur unkontrollierten Freisetzung trophischer oder toxischer Substanzen. Ein Retinaextrakt fördert in geringer Konzentration und inhibiert bei höheren Konzentrationen die Phagozytose von RPE Zellen in vitro.

### 5.3.5. Komplettmedien

Im letzten Schritt der dargestellten Medientestung wurde der Einfluss von Vollmedien untersucht, um die Effekte der zugegebenen Einzelsupplemente aufzuzeigen.

Das Vollmedium F99<sub>RPE</sub> wurde für die optimale Expansion von RPE Zellen in vitro entwickelt (Engelmann, et al. 2004, Valtink, et al. 1999b, Ventura, et al. 1996). Dabei besteht die Originalrezeptur aus Basalmedium F99 mit 15 % ChCM, 10 % FCS, 1 µg /ml Insulin, 1 mM Natriumpyruvat und Antibiosezusatz. Ein weiteres neues Vollmedium (F99<sub>RPE\_RE</sub>) enthält anstatt ChCM 1 % RE.

Dabei zeigte sich, dass 10 % Serum die Phagozytose stimuliert (siehe 5.3.3.). Ein weiterer Zusatz von Insulin und Pyruvat verringerte diesen Effekt. Dabei ist noch nicht klar wie diese Wirkung zu Stande kommt. Die serumfreie Phagozytose von RPE Zellen wird bei entsprechend eingesetzter Insulinkonzentration gesteigert (Miceli, et al. 1994), wenn Insulin direkt vor Testbeginn hinzugegeben wird. Der Insulineinfluss nach 24 Stunden Präinkubation ist nicht bekannt. Der alleinige Effekt von Pyruvat auf die Phagozytose von RPE Zellen wurde noch nicht untersucht, aber die unspezifische Phagozytose von Latexpartikeln durch Leukozyten wird bei direkter Zugabe stimuliert (Boxer, et al. 1977).

Die additive Supplementierung von 15 % ChCM und 1 % RE weisen hier den gleichen Effekt auf, wie unter serumfreien und nicht supplementierten Bedingungen (siehe 5.4.3. und 5.4.4.). Wie schon zuvor beobachtet, führt eine Stimulation der Phagozytose durch Serumzugabe nicht unweigerlich zum gleichen Ausmaß (siehe 5.4.2.). Abermals zeigte sich dieser interferierende Effekt, da 15 % ChCM die Serumstimulation mindert. Diese Effekte beruhen vermutlich auf spezifischen Einzelkomponenten, die zurzeit noch nicht identifiziert wurden.

Schlussfolgernd kann festgehalten werden, dass mit der Testung von Zellfunktionen, wie der Phagozytose, Wirkungen von Medienkomponenten identifiziert werden konnten, die für die Weiterentwicklung des RPE Tissue Engineering wichtig sind. In vitro stehen die Proliferation, der Erhalt von zellinmanenten Charakteristika sowie die Zellfunktion im Zusammenhang. Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass komplexe Zusätze wie ChCM und RE, die unter anderem ihre Anwendung beim Erhalt differenzierter Zelleigenschaften in vitro finden, auch die Phagozytosefähigkeit beeinflussen. Es kommt insbesondere auf die richtige Dosierung an, so dass diese Zellfunktion nicht beeinflusst oder sogar gefördert wird. Obwohl jetzt die Einzeleinflüsse von ChCM und RE auf die Phagozytose bekannt sind sollte beachtet werden, dass sich deren Wirkung in Gegenwart anderer Supplemente quantitativ verändert.

Das ultimative Ziel beim Studium von Zellkulturmedienbedingungen ist die Herstellung definierter Medien für konkrete Experimentbedingungen (Bottenstein, et al. 1979a, Bottenstein, et al. 1979b, Mather 1998). Denn erst ein serumfreies definiertes Medium kann reproduzierbar eine Vergleichbarkeit und Qualitätsgarantie in der Herstellung von Zellen in vitro gewährleisten. Dieses ist für das RPE insbesondere von Interesse für das Tissue Engineering als auch für die Grundlagenforschung. Die Entwicklung von geeigneten Verfahren zur Aufbereitung, Expansion und Lagerung von RPE Zellen oder der Prädifferenzierung von Vorläufer oder Stammzellen in vitro sind essentiell für die Bereitstellung einer potentiellen RPE Gewebeersatztherapie. In beiden Fällen ist man angewiesen auf eine Zellvermehrung in vitro unter kontrollierten Bedingungen (Dutt, et al. 2003, Lu, et al. 2001, Shih, et al. 2002). Die möglicherweise notwendige Spendertypisierung führt zur Aufbewahrung von RPE Zellen mittels Kryokonservierung in einer RPE Zellbank (Valtink, et al. 1999a), was wiederum ebenfalls adäquate Zellkulturbedingungen nach dem Auftauen und vor der Transplantation beansprucht. Der Erhalt oder die

Wiederherstellung nach Zellexpansion und Kryokonservierung, des den in vivo Bedingungen entsprechenden Zellphänotyp, der Morphologie und der Zellfunktionen, sind essentiell für eine erfolgreiche Zellersatztransplantation. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen die Notwendigkeit sehr präzise definierter Zellkulturmedien für die Grundlagenforschung als auch für das Tissue Engineering von RPE Zelltransplantaten.

## 5.4. Physiologie der RPE Phagozytose

Die Untersuchungen zur Physiologie der Phagozytose von RPE Zellen zeigen auf einem neuen Wege die Beteiligung der MerTK Rezeptortyrosinkinase und dessen potentiellen Liganden Gas6. Ebenfalls wird die Rolle eines zusätzlichen Liganden im Serum bestätigt.

Mit dem Ziel die funktionelle Beteiligung der  $Ca^{2+}$  Kanäle bei der Phagozytose zu identifizieren, wurde in weiteren Experimenten  $Ca^{2+}$  Kanal assoziierte Signaltransduktionspartner untersucht. Bekannterweise interagieren der Wachstumsfaktor bFGF und die zytosolische Tyrosinkinase pp60<sup>c-src</sup> mit L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle vom Subtyp alpha1D (Cav1.3) am RPE (Rosenthal, et al. 2001, Rosenthal, et al. 2002, Strauss, et al. 2000). Hier konnte gezeigt werden, dass diese Cav1.3 Modulatoren, bFGF extrazellulär und pp60<sup>c-src</sup> intrazellulär, potentiell an der Phagozytoseregulation beteiligt sind (Karl, et al. 2002).

### 5.4.1. Beteiligung von MerTK /Gas6

DIE MER-REZEPTORTYROSINKINASE (MERTK) MIT LIGAND GAS6 und Protein S sind essentieller Bestandteil der Phagozytose von RPE Zellen abgescherter Photorezeptoraußensegmente (OS) und damit vital für die Funktion und das Überleben der Photorezeptoren in der Retina.

Die Erkennung, die Anbindung und die Aufnahme der OS sind die wichtigen Schritte der Phagozytose. Für das RPE wurden bis dato eine ganze Reihe an Rezeptoren und Signalmolekülen identifiziert, welche einerseits möglicherweise einzeln und andererseits in Form eines Multirezeptorkomplexes agieren. Dabei gibt es für beide Fälle Varianten, die keinen OS Kontakt benötigen, möglicherweise auch basolateral lokalisiert sein könnten (Finnemann, et al. 2001) und die direkte Interaktion mit den OS in benötigen (Wu, et al. 2005).

#### 5.4.1.1 Immunhistochemie

In immunhisto- und zytochemischen Untersuchungen wurde in dieser Arbeit das Vorhandensein von MerTK und Gas6 im RPE und der Photorezeptorschicht an humanen Gewebeschnitten sowie in SV40-RPE Zellen in vitro gezeigt.

Die in dieser Arbeit verwendeten polyklonalen Antikörper gegen MerTK (gegen N-terminale Peptidsequenz) und dessen potentiellen Liganden Gas6 (C-terminale Peptidsequenz) sind die ersten kommerziell erhältlichen. Der Nachweis der Rezeptortyrosinkinasen MerTK und eines potentiellen Liganden Gas6 mittels Immunhistochemie wurden aus verschiedenen Gründen verfolgt. Der Nachweis von MerTK im RPE konnte erstmals auf diesem Wege bestätigt werden. Ausserdem wurde die humane Retina auf MerTK gefärbt und diese konnte auch in der Photorezeptorschicht lokalisiert werden. Inwiefern der Rezeptor dort an der Phagozytose beteiligt ist, ist nicht geklärt.

Die Expression von Gas6 in der Retina der Ratte konnte zuvor mittels Northern Blot gezeigt werden (Hall, et al. 2001). Mögliche Quellen des Gas6 in der Retina in vivo waren bis vor kurzem nicht be-

kennt. Potentielle Kandidaten stellen das RPE selbst, die Photorezeptoren oder die Müller Gliazellen dar (Hall, et al. 2005). In dieser Arbeit konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass die RPE Zellen selbst möglicherweise Gas6 bereitstellen. Eine moderate Färbung im Bereich der Photorezeptoren lässt dort ebenfalls Gas6 vermuten. Ob Gas6 deshalb auch von Photorezeptoren oder Müllerzellen bereitgestellt wird, oder ob nur das vom RPE sezernierte Protein an die Außensegmente gebunden hat, bleibt unklar. Eine geringe Positivität der äußeren limitierenden Membran der Retina, welche durch die Adhärensverbindungen der Photorezeptorinnensegmente und den Müller Zellen zu Stande kommt, wurde auch in der Immunhistochemie der humanen Retina gefunden. Ob die Müller Zellen MerTK exprimieren, kann aus diesen Untersuchungen nicht geschlossen werden.

Als intrinsische Positivkontrolle wurde die Färbung von Thrombozyten (Angelillo-Scherrer, et al. 2001, Chen, et al. 2004, Ishimoto, et al. 2000) und weiteren Gas6 exprimierende hämatopoetische Zellen (Graham, et al. 1994) in Blutgefäßen der Retina angenommen. Hier zeigte sich unter Aussparung der Erythrozyten, die kein Gas6 aufweisen (Ishimoto, et al. 2000), die positive Färbung von anderen Zellen im Gefäßlumen. Die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigten die Spezifität der Antikörper, so dass in weiteren Versuchen der funktionelle Einfluss der Antikörper auf die Phagozytose getestet werden konnte.

Mit dem Ziel die funktionelle Beteiligung von MerTK und Gas6 bei der Phagozytose von RPE Zellen zu testen, wurde zuerst das Vorhandensein beider Signaltransduktionspartner in der SV40-RPE Zelllinie gezeigt. SV40-RPE wies eine gute Antigenexpression für MerTK und Gas6 auf. Dadurch wurde abermals die Zelllinie validiert und erstmals die Expression von Gas6 in vitro am RPE gezeigt.

Somit stellt RPE auch in vitro eine mögliche Quelle des Gas6 dar. Vielleicht ist diese Beobachtung insbesondere unter serumfreien Bedingungen bedeutsam, wenn, wie zum Teil in dieser Arbeit, der vor Phagozytosemessung die Zellen 24 Stunden serumfrei kultiviert wurden. Denn in serumreduzierter Zellkultur von humanen Fibroblasten sowie NIH 3T3 Zellen wurde die verstärkte Expression von Gas6 beschrieben (Manfioletti, et al. 1993). Diese Hypothese am RPE zu testen ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Die Expression von Gas6 mRNA konnte in SV40-RPE, der ARPE Zelllinie sowie in frischem humanem RPE nachgewiesen werden (unveröffentlichte Arbeiten von Dr. rer. nat. Sönke Wimmers aus dem Labor von Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauss).

Zusammengefasst bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse vorhergehende Untersuchungen, bei denen die Expression von MerTK und Gas6 in Retina und RPE mittels PCR und Western-Blot gezeigt wurden (D'Cruz, et al. 2000, Dufour, et al. 2003, Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2005, Nandrot, et al. 2000). Desweiteren wird die potentielle Beteiligung von Gas6 als Ligand der MerTK an der OS Phagozytose von RPE Zellen nicht nur in vitro, sondern möglicherweise auch in vivo unterstützt (Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2003b).

Hier wurde erstmals die MerTK Expression in der Photorezeptorschicht der Retina gezeigt, wobei ein möglicher Zusammenhang mit der Phagozytose bisher nicht klar ist. Die Photorezeptorschicht im Gewebeschnitt weist auch Gas6 auf. Ob Gas6 auch von Photorezeptoren oder Müller Zellen zusätzlich zum RPE zur Verfügung gestellt wird, muss noch in weiteren Untersuchungen festgestellt werden.

Die SV40 RPE Zelllinie weist MerTK Rezeptor und Gas6 Ligand entsprechend den in vivo Beobachtungen auf und stellt damit eine valide Zelllinie für funktionelle Phagozytosestudien auch unter serumfreien Bedingungen dar.

### 5.4.1.2 Phagozytose

Durch Blockierung mit Antikörpern (Ak) gegen MerTK und Gas6 konnte auf einem neuen Wege erstmals bestätigt werden, dass MerTK, dessen Ligand Gas6 und ein weiterer Ligand (möglicherweise Protein S) im Serum an der OS Phagozytose von RPE in vitro beteiligt sind. Die Beobachtungen lassen sich wie folgt interpretieren.

Die OS Aufnahme wurde unter serumfreien Bedingungen konzentrationsabhängig mittels MerTK-Ak inhibiert. Dass Aufnahme und Anbindung unterschiedlichen Rezeptoren unterliegen wurde vielfach in der Literatur aufgezeigt (Finnemann, et al. 2001, Finnemann 2003a, Hall, et al. 1987). Dennoch ist nicht überzeugend geklärt, ob die Aufnahmeregulation über MerTK nicht auch einen potenzierenden Anteil an der Anbindung der OS hat (Wu, et al. 2005).

Die OS Anbindung wurde auch bei allen untersuchten Antikörperkonzentrationen geringfügig, aber signifikant reduziert. Doch unterlag dieser Effekt keiner Konzentrationsabhängigkeit, sondern einer Reduktion gleicher Größe und einer höheren Schwankungsbreite. Für die einheitlich geringere Bindung sind verschiedene Gründe möglich. Artificielle Ursachen wären ein eigener Effekt von IgG Antikörper, sterische Beeinflussung und Aggregation von Photorezeptoren. IgG Antikörper wiesen in der Literatur bis dato keinen eigenen Effekt auf die Phagozytose von RPE Zellen auf (Finnemann, et al. 1999, Finnemann, et al. 2001, Finnemann 2003a).

Eine sterische Beeinflussung der OS Anbindung durch die Antikörper ist unwahrscheinlich, aber vielleicht möglich, wenn OS wirklich, wie in der immunhistochemischen Färbung beobachtet, auch MerTK exprimieren. Daher könnten die OS an die potentiellen Bindungsrezeptoren, wie zum Beispiel  $\alpha\beta 5$  Integrine, die mit MerTK lokalisieren nicht mehr anbinden (Abb. 4.3). Desweiteren könnte es aufgrund von MerTK in OS Membranen zu Verklumpungen und durch die Waschschriffe zu unregelmäßigem Verlust angebundener OS kommen.

Bei der RCS Ratte, einem Tiermodell für erbliche retinale Degeneration ist aufgrund funktionsloser MerTK die Phagozytose nicht mehr effizient genug. Das führt in vitro zum Verlust der Phagozytostimulation mittels Gas6, Protein S und Serum (Chaitin, et al. 1983b, Edwards, et al. 1977, Edwards, et al. 1986, Edwards 1991, Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2005). Dabei zeigte die Phagozytose von RCS-RPE Zellen in vitro eine geringfügig höhere basale Aufnahme unter serumfreien Bedingungen als unter Serumstimulation im Vergleich zur serumfreien Phagozytose von gesundem RPE. Dem MerTK Rezeptor wird beim RPE eine Hauptrolle bei der OS Aufnahme zugemessen ohne eigenen Einfluss auf die Anbindung (Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2005).

Im Vergleich zum MerTK defizienten RPE war MerTK aber in den hier durchgeführten Untersuchungen voll funktionsfähig und lediglich die Anlagerung des Liganden wurde blockiert. Desweiteren könnten schon mit Liganden besetzte Rezeptoren nicht geblockt werden. Dadurch gab es möglicherweise Membranareale mit und ohne blockierte Phagozytose. Weiterhin wurde für das RPE gezeigt, dass das OS bindende Integrin  $\alpha\beta 5$  den MerTK Rezeptor aktiviert (Finnemann 2003b, Nandrot, et al. 2004b).

In anderen Zellsystemen (z.B. Phagozytose der Makrophagen und Dendritenzellen) wurde ein umgekehrter Kommunikationstyp gezeigt, so dass eine zweiseitige Kommunikation der Systemen möglich wäre (Hu, et al. 2004, Wu, et al. 2005). Auf diese Weise könnte ein mit Antikörper blockierter MerTK durch Stimulation anderer Membranrezeptoren auf intrazellulärem Wege phosphoryliert und damit

aktiviert werden. Dieser Weg wäre bei der RCS Ratte, der Mer<sup>KD</sup> (Rezeptortyrosinkinase ist funktionslos<sup>5</sup>) Maus sowie der Mer defizienten Maus nicht wirksam. In einer Studie wurde auch eine agonistische Wirkung von MerTK Antikörper gezeigt, wobei die Quelle des Antikörpers leider nicht zitiert wurde (Todt, et al. 2004).

Schlussfolgernd könnte die Unterbrechung der MerTK Signaltransduktion durch Antikörper zu einer limitierten Bereitstellung oder einem gestörten Membranverteilungsmuster OS bindender Rezeptoren führen. Ferner ist nicht klar, ob der verwendete Antikörper nicht auch agonistische Funktion aufweist. Letztendlich bleibt der mögliche Einfluss auf OS Anbindung und ein potentieller Zusammenhang mit der Aufnahme vorerst ungeklärt.

Die Phagozytose von RPE Zellen in vitro ist stimulierbar durch Serumzugabe, dabei sind beide MerTK Liganden, Gas6 und Protein S, darin verfügbar. Hall et. al konnten zeigen, dass die maximale Steigerung unter Gas6 oder Protein S dem maximalen Serumeffekt entspricht (Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2003b, Hall, et al. 2005). Die hier untersuchte serumstimulierte Phagozytose war durch MerTK-Ak nur geringfügig bei maximal getesteter Antikörperkonzentration hemmbar. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass unter Serumzugabe Gas6 nur einen geringen Anteil an der Serumstimulation hatte. Gas6 ist nur ein möglicher Ligand der für MerTK beschrieben wurde. Ein verwandter Serumfaktor ist Protein S, welcher auch mit MerTK reagiert. Protein S ist zu 43 % homolog zu Gas6 (in Bezug auf die Aminosäuresequenz; (Manfioletti, et al. 1993)) und beide sind Liganden für Mitglieder der Axl, Mer und Tyro3 Rezeptortyrosinkinasen (Chen, et al. 1997, Funakoshi, et al. 2002, Godowski, et al. 1995). Die Ergebnisse bestätigen erstmals, dass der Effekt der Serumstimulation hauptsächlich durch Protein S getragen wird. Zuvor konnte Gas6 nur nach Konzentrierung durch Immunoprecipitation im Serum detektiert werden und humanes Blut enthält weniger als 1 µg/ml Gas6 (Hall, et al. 2005). Protein S ist reichlich in Serum vorhanden (Dahlback, et al. 1981)

Der Gas6-Ak senkte die OS Aufnahme ebenfalls konzentrationsabhängig in Serumfreiheit. Ein geringfügiger negativer Einfluss auf die Anbindung war nur bei maximaler Antikörperkonzentration zu verzeichnen. Theoretisch führten die Antikörper zum Abfangen von freien, OS gebundenen und MerTK gebundenen Gas6. Inwieweit Antikörper gebundenes Gas6 noch MerTK aktiviert, ist nicht bekannt. Auf jeden Fall könnte theoretisch die Inhibition unter Gas6-Ak stärker sein als unter MerTK-Ak, da Gas6 besetzte MerTK unter Gas6-Ak blockiert wurden, aber unter MerTK-Ak nicht.

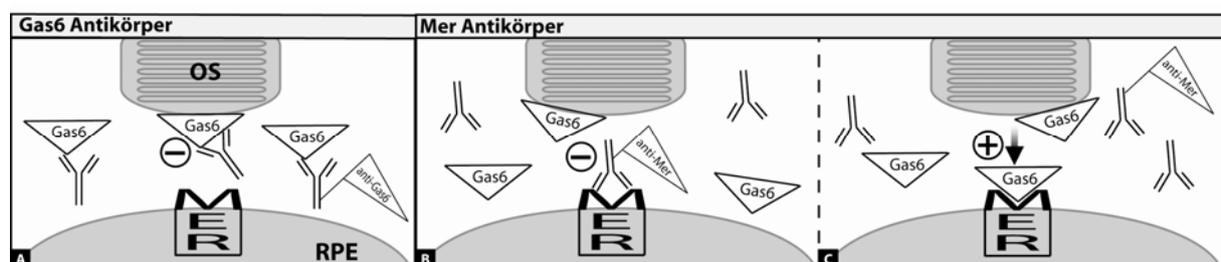


Abb. 4.3: Modell der OS Phagozytose des serumfreien RPE nach Inkubation mit selektiven Antikörpern gegen: A) Gas6: alle Gas6 Liganden werden abgefangen und eine Assoziation von OS mit dem MerTK Rezeptor auf RPE Zellen kommt nicht zustande; B+C) Mer: Nur MerTK Rezeptoren, die nicht (B) durch autokrines Gas6 des RPE besetzt sind werden mit Antikörpern blockiert, so dass partiell (C) eine OS Aufnahme möglich sein könnte.

<sup>5</sup> KD (engl.) kinase death

Unter Serumzugabe kam es zu einer signifikanten moderaten Inhibierung der OS Aufnahme, die etwa 10 % größer als unter MerTK-Ak war. Diese Differenz könnte zustande kommen, da auch Gas6 besetzte Rezeptoren geblockt werden. (Abb. 4.3).

Die OS Phagozytose von RPE Zellen hat, wie in der Einleitung erläutert, viele Parallelen mit der Phagozytose apoptotischen Materials. Hu et al. konnten kürzlich zeigen, dass ein Antikörper gegen die N-terminale Region von MerTK die Aufnahme apoptotischer Thymozyten durch peritoneale und alveolare Makrophagen inhibiert (Hu, et al. 2004). Und Shacter et al. (2000) zeigten, dass Protein S eine aktive Komponente im Serum ist, die die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen stimuliert.

#### 5.4.2. Beteiligung von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen

SPANNUNGSABHÄNGIGE L-TYP  $Ca^{2+}$  KANÄLE werden spezifisch durch Nifedipin blockiert, was eine Reduktion der OS Phagozytose an humanen SV40-RPE, humanen primären RPE und primären RPE von Kontrollratten bewirkte. Diese äußerte sich in einer konzentrationsabhängigen Inhibierung von Anbindung und Aufnahme nach 1 Stunde und auch noch nach 4 Stunden OS Inkubation an SV40-RPE. Dieser Effekt zeigte sich auch unter Serumstimulation. An den primären humanen RPE Zellen zeigte sich auch eine Reduktion nach 4 Stunden OS Inkubation, jedoch fiel die Inhibierung bei gleichzeitiger Serumstimulation geringer als an den SV40RPE Zellen aus. In einem Experiment konnte kein Nifedipineinfluss nach 1 Stunde Phagozytose beobachtet werden (Fig. 3.26).

L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle sind charakterisiert und definiert durch ihre Sensitivität auf Dihydropyridinderivate, wie Nifedipin. Nifedipin blockiert L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle bis 5  $\mu M$  spezifisch. Bei höheren Konzentrationen werden auch spannungsabhängige Kaliumkanäle (z.B. Kv1.3, Kv3.1) inhibiert (Conley, et al. 1999). Die Beobachtung, dass Nifedipin ab einer Konzentration von 0.5  $\mu M$  und konzentrationsabhängig effektiv war, lässt auf eine Beteiligung von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen schließen.

Da Anbindung und Aufnahme reduziert wurden, könnte der  $Ca^{2+}$  Kanal alleinig an der Modulation der Anbindung beteiligt sein und somit die Phagozytose im Gesamten reduzieren. Durch eine verminderte Anbindung von OS würde auch die Aufnahme reduziert.  $Ca^{2+}$  Kanäle könnten aber auch die Modulation beider Prozesse getrennt betreffen, beide zusammen oder aber sogar bei mehreren Einzelprozessen involviert sein.

Eine Inhibierung durch Nifedipin an SV40-RPE war auch unter Serumstimulation zu beobachten. Bei zunehmender Serumkonzentration war der negative Einfluss von Nifedipin proportional. Aber an RPE Primärkulturen wurde die serumstimulierte Aufnahme der Phagozytose durch 1  $\mu M$  Nifedipin nicht unterdrückt. Hier sind noch weitere Untersuchungen mit höheren Nifedipinkonzentrationen an Zellen verschiedener Spender notwendig, bevor eine endgültige Aussage getroffen werden kann.

Auch schon nach 1 Stunde OS Inkubation war eine Beteiligung von  $Ca^{2+}$  Kanälen an SV40-RPE zu ermitteln. Der in einer Messung beobachtete geringeren Einfluss nach 1 Stunde OS Inkubation auf RPE Zellkulturen eines humanen Spenders muss ebenfalls erst noch in weiteren Untersuchungen bestätigt werden. Diese Untersuchungen werden wichtig sein, um den zeitlichen Einfluss der  $Ca^{2+}$  Kanalregulation bei der Phagozytose zu verstehen.

Frisch isolierte, als auch kultivierte RPE Zellen weisen funktionelle L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle auf (Sakai, et al. 1997, Strauss, et al. 1994a, 1994b, Strauss, et al. 1997, Ueda, et al. 1993, 1995). Die hier dargestellte

Inhibierung der Phagozytose von RPE Zellen durch Nifedipin lässt darauf schließen, dass Nifedipin sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle beteiligt sind. Dennoch konnte keine vollständige Reduktion der Phagozytose erzielt werden. Ob nun die Phagozytose von RPE Zellen daher nur partiell auf den Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  angewiesen ist oder ob L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle nur partiell an diesem beteiligt oder nicht vollständig durch Nifedipin inhibierbar (Lipscombe, et al. 2004) sind ist noch unklar.

Für ein besseres Verständnis der weiteren Diskussion möchte ich auf die Komplexität des derzeitigen Modells für Kalzium als intrazellulären Botenstoff aufmerksam machen. Kalzium ist ein hoch vielseitiges intrazelluläres Signal, das viele verschiedene zelluläre Funktionen regulieren kann (Carafoli, et al. 2001). Man muss davon ausgehen das Zellen, wie auch das RPE, Zugriff auf ein großes Arsenal an Signalteilnehmer haben. Diese können zu Signalsystemen gekoppelt werden, welche unterschiedliche räumliche und zeitliche Eigenschaften besitzen (Berridge, et al. 1999, Berridge, et al. 2000, Berridge, et al. 2003, Bootman, et al. 1995, Bootman, et al. 2001a, Bootman, et al. 2001b). Diese mögliche Vielseitigkeit gilt es für die individuellen Signalsysteme in der Phagozytoseregulation zu identifizieren.

Änderungen der intra- und extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration wurde schon in mehrfacher Hinsicht mit der Regulation der Phagozytose von RPE Zellen in Verbindung gebracht und  $\text{Ca}^{2+}$  spielt per se in vielfacher Weise insbesondere beim RPE wichtige Rollen (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b, Strauss 2005). RPE Zellen weisen eine besonders hohe  $\text{Ca}^{2+}$  Menge auf (Fishman, et al. 1977, Hess 1975, Panessa, et al. 1981) und haben verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$  Speicherorte, dessen Bedeutungen noch längst nicht geklärt sind. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass lokale Änderungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration mit der Phagozytose assoziiert sind (Kindzelskii, et al. 2004). Insbesondere der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle stellt ein sehr lokalisiertes Signal dar (Navedo, et al. 2005, Neher 1998, Roberts 1994).

Ohne extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  findet keine RPE-Phagozytose statt (Greenberger, et al. 1983, Hall, et al. 2001). Dabei ist  $\text{Ca}^{2+}$  für die Bindung von Gas6 und Protein S an die OS, Bindung von OS an das RPE und die Gas6 bedingte stimulierte Phagozytose notwendig (Greenberger, et al. 1983, Hall, et al. 2001, Hall, et al. 2002, Hall, et al. 2005). Besonders interessant ist die hier dargestellte Beobachtung, dass in einem serumfreien System noch Phagozytose stattfindet und Anbindung sowie Aufnahme von der extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration ebenfalls abhängig sind.

Die in meiner Arbeit durchgeführten Nifedipinexperimente zeigen eine Beteiligung von  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über L-Typ Kanäle in Gegenwart von MerTK Liganden (FCS) und in Abwesenheit (serumfrei). In wie weit der MerTK Signalweg den einzigen und /oder elementare Bestandteil für die OS spezifische Phagozytose darstellt ist nicht geklärt. Sei dies der Fall wäre ein  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom über L-Typ Kanäle bei der laut Literatur OS spezifischen schnellen als auch unspezifischen langsameren Phagozytose oder anders formuliert bei der über MerTK stimulierten versus unstimulierten Phagozytose beteiligt.

Diese Hypothese wird unterstützt durch die Beobachtung, dass die  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme in die Zelle proportional zur Konzentration der applizierten Zymosan (unspezifischer Stimulus) als auch OS Menge ist (Salceda 1992). Diese  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme konnte mittels Ruthenium Red, welches nicht selektiv spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle blockiert (Cibulsky, et al. 1999, Malecot, et al. 1998), reduziert werden (Salceda 1992). Toll-like Rezeptoren scheinen an der OS Phagozytose des RPE beteiligt zu sein (Kindzelskii, et al. 2004) und Zymosan ist ein funktioneller Ligand dieser Rezeptoren (Shiratsuchi, et al. 2004, Takeuchi, et al. 2001).

Weiterhin konnte vor kurzem erstmalig ein lokalisiertes intrazelluläres oszillierendes Kalziumsignal im RPE detektiert werden, welche mit der OS Anbindung assoziiert und paraphagosomal lokalisiert ist (Kindzelskii, et al. 2004). An Neuronen und Pankreas- $\beta$ -Zellen konnte gezeigt werden, das präferentiell L-Typ beziehungsweise Cav1.3  $Ca^{2+}$  Kanalleitfähigkeiten an  $[Ca^{2+}]_i$  Oszillationen beteiligt sind (Liu, et al. 2004, Yasumoto, et al. 2004).

Oszillierende Kalziumsignale wurden an Makrophagen über eine Aktivierung von Integrinen ausgelöst (Faccio, et al. 1998), welches auch maßgeblich an der Phagozytose von Makrophagen als auch RPE Zellen beteiligt sind (Finnemann, et al. 1999). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Retinae von  $\alpha v \beta 5$  Integrin defizienten Mäusen die zirkadian regulierte massive Phagozytosekapazität nicht mehr aufweisen und die retinale Adhäsion vermindert ist (Nandrot, et al. 2004b, Nandrot, et al. 2005). Dabei könnten Änderungen in der  $[Ca^{2+}]_i$  durch Aktivierung von Integrinen bedingt sein (Dewitt, et al. 2002, Jaconi, et al. 1993) und /oder umkehrt könnten intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Signal die Effektivität der Anbindung durch Integrine beeinflussen (Sun, et al. 2005), deren Expression (Nesti, et al. 2002a, 2002b) sowie Clusterbildung (Hato, et al. 1997, van Kooyk, et al. 2000).

Eine Aktivierung von  $\alpha v \beta 5$  führt möglicherweise weiterhin zu einen Crosstalk mit MerTK (Finnemann 2003b, 2004a, Wu, et al. 2005). Integrine (Gomez, et al. 2001, Wu, et al. 1998, Wu, et al. 2001) als auch Signalmoleküle der MerTK Signalkaskade, wie Phosphatidyl-3-kinase (Hall, et al. 2003b, Le Blanc, et al. 2004, Macrez, et al. 2001, Quignard, et al. 2001) könnten L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle regulieren. Die besagte bidirektionale Kommunikation führt schließlich zu einer Aktivierung von Rac-1 (Nandrot, et al. 2003). Rac-1 ist involviert die Regulation zytoskelettaler Umbauvorgänge wie der Polymerisation periphagosomalen F-Actins, der Lamelli- oder Pseudopodienbildung (Grabham, et al. 2003) und der phagolysosomale Fusion (Li, et al. 2003). (Valentin, et al. 2001).

Diese Vorgänge sind auch bei der Phagozytose von RPE Zellen essentiell (Burnside, et al. 1976, Burnside 1976, Chaitin, et al. 1983a, Finnemann, et al. 1999, Matsumoto, et al. 1987, Rahi, et al. 1980). An anderen Phagozyten konnte gezeigt werden, dass ein phagozytoseassoziiertes für die Pseudopodiabildung (Robles, et al. 2003) notwendiger Aktinumbau, als auch ein Membranrecycling mittels fokaler Exozytose, kalziumabhängige Prozesse sind (Bengtsson, et al. 1993, Cheng, et al. 2000, Cheng, et al. 2002, Rehder, et al. 1998, Tapper, et al. 2002, Tejle, et al. 2002).

Zusammengefasst kann an dieser Stelle angeführt werden, dass in Anlehnung an das eingangs erwähnte Modell  $Ca^{2+}$  als Signaltransmitter in der Phagozytose temporär, räumlich und in Abhängigkeit der Amplitude unterschiedliche Funktionen aufweist. Wie auch weiter im Folgenden diskutiert, kann intra- und extrazelluläres  $Ca^{2+}$  vermutlich Anteil haben an der Initialisierung, Aufrechterhaltung beziehungsweise dem Ablauf und der Terminierung der Phagozytose (Abb. 4.4).

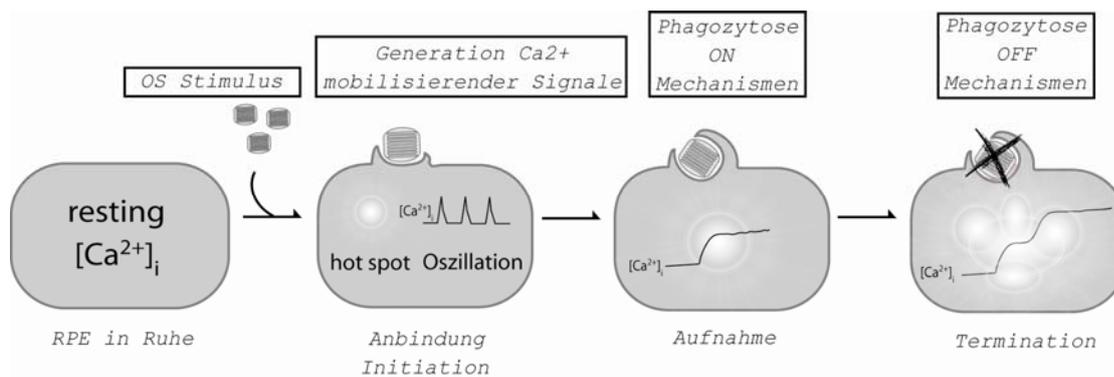


Abb. 4.4: Vereinfachtes Modell der Regulation der Phagozytose über den sekundären Botenstoff Kalzium ( $Ca^{2+}$ ). Im Prozess der Phagozytose binden zunächst Photorezeptoraußensegmente (OS) an die betreffenden Rezeptoren auf der Membranoberfläche. Damit assoziiert ein oszillierendes Kalziumsignal (Kindzelskii, et al. 2004). Mit der MerTK rezeptorvermittelten Aufnahme wird eine Signalkaskade ausgelöst, die unter anderem zum Anstieg von intrazellulären Inositoltriphosphat (InsP3) führt (Rodriguez de Turco, et al. 1992). InsP3 beeinflusst die Phagozytose als sekundären Botenstoff unter anderem durch einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$ . Dadurch kommt es vermutlich sowohl zur Aktivierung der Phagozytose, als auch nach einem weiteren Anstieg des  $[Ca^{2+}]_i$  zur Termination des Prozesses (Hall, et al. 1991b, Strauss, et al. 1998b). Die genaue Zuordnung der potentiell beteiligten L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle steht noch aus, doch eine multifunktionelle Beteiligung wäre denkbar.

Ein wichtiges Element für weitere Hypothesen und entsprechende Experimente, um die möglichen Funktionen von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle in den Signalkaskaden der Phagozytoseregulation zu erklären, spielt die Lokalisation am RPE. Ob diese apikal (zum subretinalen Spalt hin) und /oder basolateral lokalisiert sind ist nicht bekannt.

In Bezug auf Änderungen der lichtabhängigen Ionenkomposition im subretinalen Spalt sind Kalium und  $Ca^{2+}$  die wahrscheinlichsten Kandidaten für ein integriertes interzelluläres Signal zwischen neuro-naler Retina und RPE (Dmitriev, et al. 1999). Die extrazelluläre Kalziumkonzentration, welche unter Lichteinfluss steht (Gallemore, et al. 1994), im subretinalen Spalt benötigt wird für die retinale Adhäsion (Kita, et al. 1992, Marmor, et al. 1982) sowie für die lichtstimulierte Abtrennung der Photorezeptoraußensegmente (Greenberger, et al. 1983) und die Kopplung von Gas6 und MerTK (Hall, et al. 2002), wird auch durch einen Kalziumeinstrom über die apikale RPE Zellmembran verändert (Gallemore, et al. 1994, Huang, et al. 1992, Livsey, et al. 1990).

Auf die Frage, ob und wie subretinales  $Ca^{2+}$  an der Phagozytoseregulation beteiligt sein könnte, finden sich einige Hinweise, jedoch ist die verifizierende Datenlage gering. Die lichtinduzierte Phagozytose (Basinger, et al. 1976, Hollyfield, et al. 1978) ist abhängig vom extrazellulären  $Ca^{2+}$  (Greenberger, et al. 1985, Matsumoto, et al. 1987). Die subretinale Kalziumkonzentration steigt unter Lichtexposition einhergehend mit einer langsamen andauernden Abnahme (Gallemore, et al. 1988, Gallemore, et al. 1994, Li, et al. 1994a, Li, et al. 1994b). Die Blockierung der lichtinduzierten Phagozytose konnte mittels Nifedipin oder Kalziumentzug in Experimenten an Augenbechern von Fröschen gezeigt werden (Besharse, et al. 1986). Dabei führt eine Reduktion der Kalziumkonzentration im subretinalen Raum nahe am RPE möglicherweise über eine Transportmechanismus mit schneller An- und Ausschaltung am RPE (Gallemore, et al. 1994, Livsey, et al. 1990). Und der Einstrom von  $Ca^{2+}$  durch L-Typ Kanäle reagiert insbesondere empfindlich auf Veränderungen der extrazellulären  $[Ca^{2+}]_e$  im physiologischen

Bereich (Church, et al. 1996). Dies suggeriert eine Beteiligung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen am  $\text{Ca}^{2+}$  Transport aus dem subretinalen Raum in die RPE Zellen und assoziierter Phagozytoseregulation.

Bei einer möglichen basolaterale Lokalisation könnten die Kanäle einen Einstrom aus der kalziumreichen Bruch Membran (Fishman, et al. 1977) beziehen. In beiden Fällen, ob apikal und /oder basolateral, könnten eine Reihe in der Literatur beschriebener Signalwege (Nguyen-Legros, et al. 2000), Mechanismen und Funktionen assoziiert sein, für die eine Zunahme intrazellulären Kalziums gezeigt wurde. Eine Reihe bekannter Neurotransmitter, die unter anderem zirkadian als auch lichtabhängig reguliert werden, aus der Retina oder dem RPE selbst modulieren die Phagozytose und gehen mit Veränderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration einher (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b).

Die Phagozytose in vivo ist zirkadian reguliert, lichtinduzierbar und beeinflusst durch Osmolalität (Besharse, et al. 1983, Besharse, et al. 1998, LaVail 1976a, 1976b, 1980). L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle können am RPE ohne Depolarisation, sondern durch kinaseabhängige Verschiebung der Potentialabhängigkeit aktiviert werden (Malecaze, et al. 1993, Mergler, et al. 1998, Rosenthal, et al. 2001, Rosenthal, et al. 2002, Strauss, et al. 1997, Strauss, et al. 2000). Dabei könnten möglicherweise Osmolaritätsänderungen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle aktivieren (Ben-Tabou De-Leon, et al. 2003, Ben-Tabou De-Leon, et al. 2005). Diese treten im subretinalen Raum nach Lichteinfluss auf (Dornonville de la Cour 1993, Steinberg, et al. 1983, Steinberg 1985). Die intrazelluläre Kalziumkonzentration von RPE Zellen steigt nach hypoosmolarer Perfusion (Reigada, et al. 2005), jedoch ist die Kalziumquelle dabei noch nicht untersucht worden.

Eine große Reihe von autokrinen oder parakrinen Transmittern reguliert die Phagozytose von RPE Zellen (Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b), die teilweise auch L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle regulieren könnten.

Zum Beispiel wird L-Glutamat licht- und kalziumabhängig von Photorezeptoren freigesetzt (Schmitz, et al. 1996, 1997) und löst Phagozytose aus (Besharse, et al. 1988, Defoe, et al. 1989, 1992, Greenberger, et al. 1985). Prinzipiell kann L-Glutamat L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle auch indirekt über NMDA- oder Glutamatrezeptoren aktivieren (Linn, et al. 1999). Für das RPE steht der direkte Beweis noch aus. Jedoch führt L-Glutamat am RPE zu einem Anstieg an  $\text{InsP}_3$ , das abhängig von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ist und Nifedipin inhibierbar (Fragoso, et al. 1999). Ein Anstieg von  $\text{InsP}_3$ , welcher übrigens ebenfalls wiederum L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle aktivieren kann (Mergler, et al. 2002), korreliert mit dem Einsetzen (initiale Rolle) der OS Phagozytose (Rodriguez de Turco, et al. 1992).

Inwieweit diese Signalwege elementar und zeitlich sowie räumlich mit den klassischen Phagozytose-rezeptoren, wie MerTK und  $\alpha\text{v}\beta 5$ , verbunden sind, muss noch ermittelt werden. Ein Schritt in die Richtung, einen möglichen Zusammenhang von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal mit Anbindungs- oder Aufnahmerezeptor der OS Phagozytose herzustellen, war die Untersuchung von potentiellen Interaktionspartnern. Die pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase als intrazellulärer Modulator (Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 1997, Strauss, et al. 2000) und bFGF als extrazellulärer Transmitter (Rosenthal, et al. 2001, Rosenthal, et al. 2002) von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen am RPE wurden dazu untersucht und im Folgenden diskutiert. Ebenso wird die potentielle Rolle von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen bei der Phagozytose von RPE Zellen später auch im Vergleich zu den Untersuchungen an RCS RPE Zelle diskutiert.

### 5.4.3. Beteiligung von Proteintyrosinkinasen

DIE ZYTOSOLISCHE PROTEINTYROSINKINASE pp60<sup>c-src</sup> ist in hohem Maße in RPE Zellen vorhanden (Koh 1992). Sie ist vermutlich an Prozessen von Flüssigkeitstransport, Sekretion und Differenzierung beteiligt (Koh 2000). Weiterhin konnte ein direkter Einfluss an der Signaltransduktion von L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanälen in RPE Zellen gezeigt werden. Aktivierte zytosolische Proteintyrosinkinasen pp60<sup>c-src</sup> können L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalströme aktivieren (Strauss, et al. 2000) und vielleicht auch vice versa (Rosen, et al. 2001, Schindelholz, et al. 2000).

Die hier dargestellten Daten zeigen, dass pp60<sup>c-src</sup> auch ein essentieller Signalgeber in der Phagozytose ist. Beide Phagozytosephasen werden reduziert durch Herbimycin A (HA), ein zellpermeabler pp60<sup>c-src</sup> Inhibitor, der an reaktive SH-Gruppen bindet und nach 24 h Vorinkubation irreversibel hemmt (Fukazawa, et al. 1990, Fukazawa, et al. 1991, Murakami, et al. 1988, Uehara, et al. 1991).

Eine Serumstimulation der Phagozytose von RPE Zellen wird vollständig unterbunden. Daher scheint die Erkennung eines oder mehrerer Liganden im Serum, wie Protein S, Gas6 oder ein noch unidentifizierter Ligand, wie MFG-E8 (Wu, et al. 2005), für weitere Oberflächenrezeptoren des RPE, notwendig zu sein für die Aktivierung der pp60<sup>c-src</sup>.

Die Phagozytose wird unter serumfreien Bedingungen weniger reduziert. Da Serum unter HA keine Beschleunigung hervorruft und die basale, serumfreie Phagozytose nicht durch HA beeinflusst wird, scheint pp60<sup>c-src</sup> insbesondere die ligandenstimulierte Beschleunigung der Phagozytose zu steuern.

Wie auch schon zuvor aufgezeigt führt die OS Konfrontation im RPE zur gesteigerten Anzahl phosphorylierter Proteine (Heth, et al. 1988, 1991b) und die Initiation ist abhängig von Tyrosinphosphorylierung (Miceli, et al. 1994). Die Phagozytosereduktion durch Nifedipin erzielte keinen additiven Effekt, so dass aktive pp60<sup>c-src</sup> für die Teilnahme der L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanäle an der Phagozytose notwendig sind. Im Umkehrschluss ist die Phagozytosereduktion durch L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanalblockade unter serumfreien Bedingungen vermutlich nur durch eine autokrine Gas6 Stimulation des RPE in vitro möglich (Hall, et al. 2005, Manfioletti, et al. 1993). Schlussfolgernd ist der L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanal und die pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase an der OS spezifischen ligandenstimulierten Phagozytose beteiligt.

In der Signaltransduktion der OS Anbindungsrezeptoren ( $\alpha\beta 5$  Integrine) und OS Aufnahmerezeptoren (MerTK) wurde die Beteiligung von pp60<sup>c-src</sup> und eine mögliche gegenseitige Beeinflussung gezeigt (Nandrot, et al. 2004a, Nandrot, et al. 2004b, Wu, et al. 2005). Damit bildet pp60<sup>c-src</sup> das erste bekannte Bindeglied zwischen zwei bekannten OS Rezeptoren und dem L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanal, insbesondere im Signalprozess der ligandenstimulierten Phagozytose. Dass spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup> Kanäle über Integrine vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden können ist seit längerem bekannt (Gall, et al. 2003, Hescheler, et al. 2002, Waitkus-Edwards, et al. 2002, Wu, et al. 1998, Wu, et al. 2001), aber ebenso wie eine durch MerTK Aktivierung vermittelte Phagozytose am RPE noch nicht untersucht.

Der funktionelle Zusammenhang von pp60<sup>c-src</sup>, L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanal, Signalwegen von Integrinen sowie Rezeptortyrosinkinasen wurden schon bei verschiedenen physiologischen Prozessen beobachtet (Davis, et al. 1995, Wu, et al. 2001). Insbesondere der Zusammenhang der Stimulierung oder Aktivierung der Phagozytose, dem Einfluss auf die Anbindung und möglicherweise sukzessive der Aufnahme suggeriert eine funktionelle Beteiligung. Es kommen Prozesse der Phagosom-Lysosom Verschmelzung (Kjeken, et al. 2004), der fokalen Membranexozytose (Di, et al. 2003, Palfrey, et al. 2003) und

damit möglicherweise auch verknüpfter Transmitter- oder Sauerstoffradikalsekretion (Di, et al. 2001, Di, et al. 2002, Di, et al. 2003, Strauss 2005) in Frage.

#### 5.4.4. Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF

DER BASISISCHE FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR (bFGF, FGF2) appliziert für eine halbe Stunde vor und für eine Stunde während der folgenden OS Inkubation des RPE führte zu einer moderaten Inhibierung der Aufnahme. Diese Reduktion wurde bei gleichzeitiger Inhibition von pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase signifikant größer. Da die Anbindung der OS nicht nach einer Stunde gemessen werden konnte ist nicht geklärt, ob diese auch betroffen war. Bei Auswertung dieses Versuches nach 4 Stunden konnte überraschender Weise keine Veränderung der aufgenommenen OS mehr beobachtet werden, obwohl die OS Anbindung immer noch verringert war.

Um die Funktion der L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanäle an der Phagozytose-regulation weiter aufzuklären, wurde der Wachstumsfaktor bFGF untersucht. Dieser ist aus drei Gründen von Interesse. Erstens wurde er an den Photorezeptoraußensegmenten lokalisiert (Li, et al. 1997, Mascarelli, et al. 1989, Morimoto, et al. 1993, Valter, et al. 2002) und wird vom RPE sezerniert. Dabei bilden potentielle Liganden der  $\alpha_v\beta_5$  Integrine, welche die OS Anbindung vermitteln (Finnemann 2003a), einen Sekretionsreiz (Mousa, et al. 1999). Zweitens steigert die bFGF Applikation die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> im RPE mittels Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch L-Typkanäle, ohne dass eine Änderung des Membranpotentials notwendig ist (Kuriyama, et al. 1991, Mergler, et al. 1998, Rosenthal, et al. 2002). Dabei kann bFGF L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanäle vom Subtyp Ca<sub>v</sub>1.3 über eine direkte Interaktion mit bFGF Rezeptor-2 an humanen RPE Zellen aktivieren und somit unabhängig von der Aktivierung durch pp60<sup>c-src</sup> zum Kalziumeinstrom in die Zelle führen (Rosenthal, et al. 2001). Für den Fall das mehrere nifedipininhibierbare L-Typ Ca<sup>2+</sup> Kanalsubtypen am RPE funktionell vorhanden sind, könnte auf diesem Wege eine spezifische Stimulation von Cav1.3 erzielt werden. Das RPE weist funktionelle FGF Rezeptoren FGFR2 und FGFR3 in situ und FGFR2 und FGFR1 in Kultur auf (Alizadeh, et al. 2000, Alizadeh, et al. 2003, Bryckaert, et al. 1999), welche alle mit diversen Signalwegen (Bikfalvi, et al. 1998, Klint, et al. 1999, Reuss, et al. 2003) bei unseren Versuchen in Frage kommen. Erst weitere Versuche mit selektiven Rezeptorinhibitoren können genauesten Aufschluss bringen.

Die ersten Ergebnisse ohne selektive Rezeptorblockade bieten einige neue Erkenntnisse. Und das ist insbesondere im Vergleich der Ergebnisse an RCS RPE Zellen mit funktionslosem MerTK und geringer Phagozytoseaktivität interessant. Wie später diskutiert, wurden einige Unterschiede in den bFGF und Ca<sup>2+</sup> Kanal betreffenden Signalwegen zwischen gesunden RPE und RCS RPE beschrieben.

Die allgemeine Rolle von bFGF bei der Phagozytose von RPE Zellen ist überhaupt nicht geklärt und wurde in der Literatur unvollständig bearbeitet (Nguyen-Legros, et al. 2000). In nur einer Studie wurde der Effekt von bFGF, hier ebenfalls stimulierend, auf die Phagozytose von Makrophagen untersucht (Ichinose, et al. 1998). Dabei wurde ein bFGF abhängiger [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg an Makrophagen beschrieben, der von spannungsabhängigen und –unabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen getragen wird (Hackshaw, et al. 1994).

Für bFGF und das RPE werden eine Kommunikation zwischen Retina und RPE diskutiert, welche die Modulation sekretorischer Aktivität, Phagozytose und Differenzierung des RPE betreffen. Dabei können Einflüsse auf die [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Homöostase die Regulation von RPE Funktionen direkt über sekundäre Botenstoffe oder indirekt über Genexpression betreffen (Rosenthal, et al. 2002).

In der Literatur ist bisher nicht der Einfluss von bFGF Vorinkubationen kürzer als 24 Stunden mit folgender OS Applikation auf die Phagozytose von RPE Zellen gezeigt worden. In nur zwei Publikationen gibt es unterschiedliche Beobachtungen am RPE bei verschiedensten Bedingungen.

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen Beobachtungen aus vorhergehenden Untersuchungen nur zum Teil und führen zu einer neuen Interpretation der Daten, bei denen an RPE Zellen eine Reduktion der Anbindung beobachtet wurde (McLaren, et al. 1997). In dieser Arbeit wurde mit bFGF in F99 Medium ohne Serum vorinkubiert. Dadurch wurde die Anbindung zu einer Zeit (1 bis 4 Stunden nach OS Gabe) reduziert, in welche gerade die rapide Zunahme der Anbindung und Aufnahme der OS Phagozytose fällt (Hall, et al. 1987).

McLaren et al. (1997) stimulierten mit 100 ng /ml bFGF plus 5 % FCS bei 24 Stunden Vorinkubation. Dabei quantifizierten sie die Phagozytose an morphologisch diskriminierten Zellsubtypen (Typ 2 und 3). Diese wiesen erst nach 7 bis 9 Stunden eine Phagozytose auf, was den Autoren zu Folge die in vivo Situation besser repräsentiert (McLaren 1996). Eine reduzierte Anbindung und gesteigerte Aufnahme, im Vergleich zur Kontrolle, wurde nach 3 und 9 Stunden gemessen. Zu späteren Zeitpunkten war kein Unterschied mehr festzustellen. Die Autoren interpretieren die verringerte Anbindung durch eine schnellere Aufnahme der OS in die Zelle. Die in dieser Arbeit dargestellten Beobachtungen entsprechen den in oben zitierter Studie nicht quantifizierten Zellsubtyp 1, welcher in seiner Phagozytosekinetik den in der Literatur gängigen Beobachtungen entspricht (McLaren, et al. 1993).

In den von mir durchgeführten Versuchen wiesen die Zellen initial keine gesteigerte Phagozytoseaufnahme, sondern eine reduzierte Anbindung und Aufnahme bei kurzer bFGF Exposition und kurzer OS Applikation. Doch durch die unterschiedlich lange Vorinkubation von 24 Stunden und 30 Minuten, den verschiedenen Subtypen sowie dem Serumzusatz ist ein Vergleich nur bedingt möglich. Demnach kommt es unter serumfreien Bedingungen mit bFGF initial zur Inhibition der Anbindung und Aufnahme, die zeitlich versetzt später wieder verschwindet. Ob unter Umständen die scheinbar unbeeinträchtigte Aufnahme nach 4 Stunden unter Serumfreiheit und bFGF in Wirklichkeit eine gesteigerte Aufnahme, wie unter Serumstimulation und bFGF, nur zu einem späteren Zeitpunkt darstellt, bleibt offen.

In einer anderen Studie hatte die Vorinkubation mit 10 ng /ml bFGF für 24 Stunden bei gleichzeitiger Stimulation mit 1 % FCS keinen Effekt auf die OS Phagozytose nach einer Stunde (Hayashi, et al. 1996). Doch bei dieser Studie wurde eine das System nicht sättigende OS Menge zugegeben und dadurch nur geringe Grundwerte der Phagozytose erreicht (1000 OS /Loch mit 30000 Zellen). Unter diesen Bedingungen konnten die hier erbrachten Beobachtungen nicht produziert werden.

McLaren et al. (McLaren, et al. 1997) zeigten weiterhin, dass ein bFGF Antikörper die Aufnahme fast vollständig nach 11 Stunden OS Inkubation inhibierte. Es ist nicht geklärt, ob der Antikörper lediglich zur Vernetzung und damit zur gezeigten Verklumpung von bFGF an der OS Oberfläche führte und somit die Aufnahme inhibierte oder ob ein wirklicher Effekt vorlag.

Zusammengefasst wurden bis dato folgende Effekte von bFGF auf die Phagozytose beschrieben: initiale Reduzierung von Anbindung und Aufnahme und zeitlich verzögerte Stimulation der Aufnahme sowie Blockierung letzteren Effektes durch bFGF Antikörper.

Im Folgenden werden diese Beobachtungen mit in der Literatur beschriebenen Effekten von bFGF auf andere Signalwege am RPE korreliert, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken.

*Wie erklärt sich die Reduktion von Anbindung und Aufnahme der Phagozytose unter bFGF?*

Gesetzt dem Fall, der Haupthypothese, bFGF würde über eine Aktivierung des L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal (Cav1.3) zu einem Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle führen, so sind verschiedene Szenarien denkbar. Grundsätzlich, da eine Blockierung des Kanals zur Reduktion beider Phagozytosephasen führt, läge ebenfalls ein Effekt auf Anbindung und Aufnahme nahe. Dies ist initial bei bFGF Applikation der Fall. Doch der Kalziumeinstrom wäre unter den gewählten Bedingungen kein Startsignal für die Phagozytose, sondern wie auch die Kanalblockade ein Inhibitor. Die bFGF Applikation führt zu einer Erhöhung des intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dabei wurden mit 10 ng/ml bFGF kleine schnelle transiente Zunahmen von 5 % der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Basalkonzentration an fetalen humanen RPE Zellen in 20 % FCS in vitro beschrieben (Kuriyama, et al. 1991). Diese schnellen Zunahmen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  innerhalb von wenigen Minuten wurden an zytosolisch kalziumfreien Ratten RPE Zellen ebenfalls beobachtet und waren über die Zeit nicht vollständig nifedipinsensibel und involvieren daher weitere Kalziumspeicher (Mergler, et al. 1998). Vermutlich sind intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Speichern beteiligt (Kuriyama, et al. 1991), da bFGF zeitlich um 30 min verzögert auch zu einer Steigerung von InsP3 in der Zelle führt. Das wäre unter den hier gewählten Bedingungen von 30 min bFGF Vorinkubation der Fall. InsP3, am RPE lokalisiert im apikalen Bereich der Zelle (Nakanishi, et al. 1996), kann wiederum zur Aktivierung von Cav1.3 selbst führen (Mergler, et al. 2002). Die Beteiligung am InsP3 bedingten  $\text{Ca}^{2+}$  Anstieg zeigt sich auch daran, dass der InsP3 abhängige transiente  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Anstieg verkürzt und reduziert ist unter extrazellulären kalziumfreien Bedingungen (Kuriyama, et al. 1992, Strauss, et al. 1999). InsP3 kann weiterhin zur Entleerung verschiedener intrazellulärer Kalziumspeicher führen (Salceda, et al. 2000). Interessanterweise wurde der Anstieg von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  und InsP3 mit der lichtstimulierten salvenartigen Phagozytose in vivo (Rodriguez de Turco, et al. 1992) und der FCS stimulierten Aufnahmezunahme in vitro assoziiert (Heth, et al. 1994).

Diese Beobachtungen sind mit der derzeitigen Datenlage nicht in Einklang zu bringen. Denn ein Anstieg von  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  kann auch über Diacylglycerol aus der InsP3-Kaskade auch zur Aktivierung von Proteinkinase C führen. Dabei wurden in Abhängigkeit der PKC inhibierenden Pharmaka unterschiedliche Beobachtungen beschrieben, die womöglich auf deren Unspezifität oder die 4 bis 6 PKC Subtypen im RPE zurückzuführen sind (Moriarty, et al. 2000, Wood, et al. 1998). Unterschiedliche PKC Subtypen können an der Regulation von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen beteiligt sein (Callaghan, et al. 2004, Job, et al. 1998, Navedo, et al. 2005) und es gibt  $\text{Ca}^{2+}$  abhängige und unabhängige PKCs (Toker 1998). Die PKC Inhibitoren Calphostin C und Gö6976 senken Anbindung und Aufnahme (Finnemann, et al. 1999). Dabei spielt PKC eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung von  $\alpha v\beta 5$  Integrinen und deren Verbindung zu Aktinfilamenten (Finnemann, et al. 1999, Heth, et al. 1988, 1991b) und damit der OS Anbindung (Finnemann, et al. 1997a, Finnemann 2003a, Nandrot, et al. 2004b). Aber auch hier scheint es Rückkopplungsmechanismen zu geben, welche die komplexen bFGF Effekte womöglich erklären. Unterschiedliche Liganden können an Integrine binden und damit bFGF Sekretion auslösen (Mousa, et al. 1999). Und bFGF führt zur Sekretion von aFGF (Guillonneau, et al. 1997, 1998), welches nur die OS Aufnahme senkt (Hayashi, et al. 1996). Letztlich führt bFGF auch zur Sekretion von ATP, welches ebenfalls zur Inhibierung der Phagozytose führt (Gregory, et al. 1994, Mitchell 2001).

Ein weiterer Hinweis zeigte sich beim additiven Effekt von bFGF und Herbimycin A auf die Phagozytose. Die  $\text{Ca}^{2+}$  Kanalaktivität unterliegt der Regulation durch die zytosolische pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinasen

(Strauss, et al. 2000). Und auch der bFGF Effekt auf Cav1.3 ist tyrosinkinase reguliert. Doch Herbimycin A beeinflusst Cav1.3 Aktivierung durch bFGF nicht, so dass pp60<sup>c-src</sup> nicht daran beteiligt ist (Rosenthal, et al. 2001). Der für bFGF beschriebene mögliche Einfluss über FGFR1 und die direkte stimulative als auch inhibitorische Modulation der pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase kommt demnach bei den beobachteten Effekten nicht zu tragen (Klint, et al. 1999). Denn eine bFGF Stimulation bei gleichzeitiger pp60<sup>c-src</sup> Blockade zeigten einen additiv negativen Effekt auf die Phagozytose von RPE Zellen.

Eine weitere Option, die initiale Reduktion der Phagozytose, ermittelt nach 1,5 Stunden bFGF Exposition, nicht durch einen direkten Effekt auf den Signaltransduktionsapparat von Anbindung und Aufnahme zu erklären, bieten auch Änderungen in der Genexpression. Dabei ist die Modifikation verschiedenster Teilnehmer in der Signalkette denkbar (Klint, et al. 1999). Zum Beispiel konnte an NIH 3T3 Zellen eine Herunterregulation der Gas6 Expression durch bFGF gezeigt werden (Manfioletti, et al. 1993). Auch so könnte der bFGF Einfluss über einen Kalziumeinstrom durch Cav1.3 zustande kommen (Lipscombe 2002, Lipscombe, et al. 2004).

*bFGF beeinflusst weitere Signaltransmitter, die zu einer Steigerung der Phagozytose führen!*

Die Steigerung von cAMP inhibiert die OS Aufnahme bei zunehmender Anbindung. bFGF antagonisiert nur die stimulierte cAMP Menge (Nash, et al. 1995). Somit könnte die Aufnahmesteigerung unter bFGF auf eine Reduktion des cAMP zurückzuführen sein. Andererseits ist der cAMP Einfluss schnell und vermutlich nicht konzentrationsabhängig, sondern unterliegt der Konzentrationsänderung (Hall, et al. 1993). Bei der geringen Datenlage ist nicht abzuschätzen, was der letztendliche Mechanismus ist.

Aber bFGF führt nicht nur zu Änderungen der Zellfunktionen über Rezeptormechanismen und Wachstumsfaktorsekretion, sondern auch über Genexpression (Guillonneau, et al. 1998, Mascarelli, et al. 1991, Mascarelli, et al. 2001, McLaren, et al. 1996, McLaren, et al. 1997). In einer aktuellen Studie konnte an RPE Zellen in vitro gezeigt werden, dass durch bFGF unter anderem die Expression von  $\alpha\beta 5$  Integrinen heraufreguliert wird (Hoffmann, et al. 2005). Damit wären zum einen mehr OS Anbindungsrezeptoren verfügbar und im Falle der MerTK Aktivierung durch  $\alpha\beta 5$  Integrine die Aufnahme gesteigert (Finnemann 2003a, Nandrot, et al. 2004b). Und tatsächlich führt schon die zusätzliche  $\beta 5$  Expression zu Steigerung von OS Anbindung und Aufnahme durch RPE in vitro (Nandrot, et al. 2004a, Nandrot, et al. 2004b). Interessant ist auch, dass nach Lichtexposition die retinale Adhäsion zunimmt (Nandrot, et al. 2004b, Nandrot, et al. 2005), wie auch die bFGF Expression (Hackett, et al. 1997, Walsh, et al. 2001, Zhou, et al. 2003).

Eine Beteiligung von bFGF an Integrin vermittelten Signalkaskaden an der Regulation von phagozytoseimmanenten Prozessen wie Migration und Membranmotilität (z.B. Pseudopodia) sind in der Literatur vielfach assoziierte Prozesse (Klint, et al. 1999, Milner, et al. 1999, Simpson, et al. 1999, Spraul, et al. 2004). Dabei wurde die Bildung von Pseudopodia mit einer Verzögerung von >24 h nach bFGF Applikation durch integrinabhängige Stimulation von Rac1 an glatten Muskelzellen beobachtet (Fera, et al. 2004). Und Rac1 kolokalisiert mit angebondenen OS am RPE und führt durch Integrin reguliert zur Aufnahme in die Zelle (Nandrot, et al. 2003)

Zusammengefasst könnten die bFGF bedingten Effekte auf die Phagozytose über viele Wege zustande kommen. Auffallend ist ein gemeinsamer  $[Ca^{2+}]_i$  Anstieg der wiederum durch verschiedenste Transmitter potenziert oder attenuiert werden kann. Dabei dominiert unter maximaler  $[Ca^{2+}]_i$  Verfügbarkeit nach Ionomycingabe die Reduktion von Anbindung und Aufnahme (Hall, et al. 1991b). Insgesamt scheint

die bFGF Modulation der Phagozytosephasen einer differenzierten räumlichen und zeitlichen Abstimmung von Kalziumsignalen zu unterliegen. Auch Cav1.3 ist möglicherweise vielfach daran beteiligt, wobei potentiell pp60<sup>c-src</sup> und bFGF zeitlich (direkt initial und/ oder über Genexpression) und räumlich (intra- versus extrazellulär) unabhängig diesen aktivieren und involvieren. Es ist nicht geklärt, ob nicht auch sehr lokalisierte bFGF stimulierte L-Typ Ca<sup>2+</sup> Signale, wie sie an Neuronen beobachtet wurden (Archer, et al. 1999), beteiligt sein könnten.

## 5.5. Pathophysiologie der RPE Phagozytose

DIE ROYAL COLLEGE OF SURGEONS RATTE (RCS-Ratte) ist eines der wichtigsten und das am längstem bekannte Tiermodell für hereditäre retinale Degeneration (LaVail 1983, Strauss, et al. 1998b). Die Mutation im c-mer Gen führt zu einer funktionlosen MerTK. Die Defizienz in der zirkadian-, licht- beziehungsweise ligandenstimulierten Phagozytoseaktivität erlaubt RCS-RPE Zellen in vivo und in vitro nur noch eine geringfügige Aufnahme von OS. Einhergehend mit der OS Akkumulation im subretinalen Spalt kommt es zu einer Form der Retinadegeneration, die auch beim Menschen gefunden wurde (Gal, et al. 2000). Aufgrund der Mutation im c-mer Gen kommt es auch in einer Menge anderer Signalwege, nicht nur die Phagozytose betreffend, zu Fehlregulationen (Dufour, et al. 2003, Nguyen-Legros, et al. 2000, Strauss, et al. 1998b).

In Bezug auf die hier durchgeführten Experimente konnte bisher gezeigt werden, dass in dystrophischen Ratten RPE Zellen eine erhöhte L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalaktivität sowie eine gestörte Regulation durch Phosphorylierung (Mergler, et al. 1998, Mergler, et al. 2002, Strauss, et al. 1993, Strauss, et al. 1997); u.a. durch FGFR2 besteht (Rosenthal, et al. 2001).

Weiterhin liegt in RCS RPE ein verändertes InsP3/ Ca<sup>2+</sup> System vor (Hall, et al. 1996b, Heth, et al. 1994, Heth, et al. 1995), zwei andere wesentliche Phagozytoserezeptoren (CD36 und Mannoserezeptor) werden vermindert exprimiert (Sparrow, et al. 1997, Wilt, et al. 1999a), Veränderungen im cAMP System (Gregory, et al. 1992, Nash, et al. 1995) und eine veränderte Expression von bFGF sowie dessen Rezeptoren sind beschrieben worden (Connolly, et al. 1992, Hayashi, et al. 1996, Malecaze, et al. 1993, McLaren, et al. 1996, McLaren, et al. 1997, Rakoczy, et al. 1993).

Eine Aufklärung der exakten Signalwege bei der Phagozytose ist insbesondere wieder von großem Interesse, seitdem Gene der Phagozytosesignalkaskade in Zusammenhang mit Formen altersabhängiger Retinadegeneration (Kindzelskii, et al. 2004, Nandrot, et al. 2004b), der pathologischen Angiogenese (Higgins, et al. 2003) und dem Immunprivileg des subretinalen Spaltes (Willermain, et al. 2002) gebracht wurden. Dadurch sind die RCS-Ratte und seit neuestem auch die MerTK knock-out Maus wertvolle Modelle im Studium der OS Phagozytosephysiologie.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann über die Zusammenhänge der im Folgenden diskutierten Ergebnisse und den dabei zugrunde liegenden Bedingungen meist nur spekuliert werden. Doch einerseits konnte gezeigt werden, dass die betrachteten Signalsysteme noch involviert und gegebenenfalls auch verändert sind in ihrer Funktion. Andererseits stützen diese neuen Beobachtungen hinsichtlich der Systeme von sekundären Botenstoffen und der Ca<sup>2+</sup>-Kanalregulation erneut die Bedeutung von c-mer für die normale Entwicklung, Differenzierung und damit Funktionalität der RPE Zellen.

### 5.5.1. Phagozytosedefizit durch MerTK Mutation

Für die Validierung des in dieser Arbeit etablierten Phagozytoseassays wurde die in der Literatur (Chaitin, et al. 1983b, Edwards, et al. 1986, Hall, et al. 1987, LaVail 1983) beschriebene fehlende Serumstimulation der Phagozytose von RCS-RPE Zellen erfolgreich reproduziert. Das gewählte Alter der verwendeten Ratten (8 – 11 Tage) liegt vor dem Beginn der ersten morphologischen Veränderungen der neuronalen Retina durch die Degeneration der RCS Ratte (Davidorf, et al. 1991). Es wurde abermals deutlich, dass Serum die OS Aufnahme sogar reduziert, wobei die Anbindung zunimmt. Die Hintergründe für diese Effekte sind bis dato nicht geklärt. Es ist eindeutig, dass ein von MerTK ausgehendes Signal durch Proteinphosphorylierung im RCS RPE fehlt. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein solches Signal von dem potentiellen OS Anbindungszepreptor Integrin  $\alpha v \beta 5$  ausgeht und somit möglicherweise mit MerTK interagiert - „crosstalk“ – diesen jedoch nicht ersetzen kann. Und vice versa - Knock-out Mäusen von Integrin  $\beta 5^{-/-}$  weisen keine zirkadian geregelte Phagozytose auf. Der charakteristischen morgendlichen lichtinduzierten Phagozytose „Burst“ in vivo und die schnelle vermehrte OS Aufnahme in vitro fehlen. Dabei findet die Phosphorylierung von MerTK nicht statt.

### 5.5.2. Beteiligung von L-Typ $Ca^{2+}$ -Kanälen

Hier konnte gezeigt werden, dass die Blockade von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen in nicht-dystrophischen Ratten RPE Zellen wie bei humanen RPE Zellen mittels Nifedipin die Phagozytose in Anbindung und Aufnahme reduziert. Diese Inhibition ist a) in der erste Stunde der OS Phagozytose am effektivsten, b) auch nach vier Stunden noch signifikant wirksam und das c) auch in Gegenwart von Serum. Nach zwölf Stunden OS Phagozytose konnte jedoch kein Einfluss mehr nachgewiesen werden.

Überraschenderweise wurde bei den Untersuchungen am MerTK defizienten RCS-RPE eine konzentrationsabhängige Stimulation beider Phagozytosephasen nach vier Stunden beobachtet. Dieser Effekt wurde mit und ohne Serumzusatz erreicht. Es kann also die MerTK unabhängige OS Phagozytose stimuliert und einer zusätzlich serumbedingten Inhibierung der Phagozytose von RCS-RPE Zellen durch L-Typ  $Ca^{2+}$ -Kanalblockade entgegengewirkt werden. Wurde die OS Inkubation mit Nifedipin über zwölf Stunden durchgeführt, so konnte in einem Experiment eine Reduktion ermittelt werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse bestätigen erneut Veränderungen in der Kalziumhomöostase des RCS-RPE. Die pathophysiologischen Bedingungen im RPE der RCS Ratten gehen mit Erhöhungen in der  $Ca^{2+}$  Leitfähigkeit und Modulation der L-Typ Kanäle (Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 1993, Strauss, et al. 1997, Strauss, et al. 1998b) sowie der intrazellulären Kalziumhomöostase (Himpens, et al. 1999, Himpens, et al. 2000, Stalmans, et al. 1997, 1998, 1999) einher. Damit war fraglich, ob eine  $Ca^{2+}$  Kanalblockade noch effektiv die Phagozytose reduzieren würde. Die hier beobachteten Effekte bestätigten, dass ein Kalziumeinstrom über  $Ca^{2+}$  Kanäle sowohl an einer Stimulation als auch an einer Inhibierung der Prozesse beteiligt sein können. Daher scheint eine Feinregulation von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen vorhanden zu sein. In beiden beschriebenen Fällen könnten die Effekte auf eine direkte Modulation des  $Ca^{2+}$  Haushaltes und damit die Aktivierung und Deaktivierung verschiedener Signalproteine (Fall 1) und/ oder der Genexpression (Fall 2) zurückzuführen sein.

*Fall 1:* Im RCS RPE fehlt das MerTK Signal (Vollrath, et al. 2001). Dadurch kommt es zur Fehlregulation durch zu geringe oder gesteigerte Phosphorylierung mehrerer Zielproteine (Hackett, et al. 1997, Heth, et al. 1991b, 1992). Ersteres würde sich von selbst erklären können und letzteres könnte bedeuten, dass durch den Wegfall von MerTK als Zielprotein andere überstimuliert werden.

So könnte zum Beispiel die über  $\alpha\beta 5$  Integrin aktivierte zytosolische src-Tyrosinkinase nach OS Anbindung vermehrt L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle aktivieren (Waitkus-Edwards, et al. 2002, Wu, et al. 2001). Diese These wird gestützt durch die fehlende Aktivierung der MerTK nach geschalteten Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3-Kinase) (Hall, et al. 2003b). Ein Anstieg von InsP3 kommt nicht zu Stande (Heth, et al. 1994). InsP3 wiederum aktiviert normalerweise tyrosinkinasegekoppelt L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle (Mergler, et al. 2002) und ein Anstieg von InsP3 ist assoziiert mit dem Phagozytosebeginn (Heth, et al. 1994, Rodriguez de Turco, et al. 1992). Danach würde man eine verminderte L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanalaktivität in RCS-RPE erwarten. Stattdessen weist der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal eine erhöhte Leitfähigkeit nach Stimulation auf, jedoch weisen RCS-RPE Zellen keinen erhöhten basalen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Spiegel auf (Mergler, et al. 1998).

Das impliziert eine andere Hypothese. Diese beinhaltet, dass das MerTK Signal inhibitorisch für L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle wäre und somit die erhöhte Aktivität der L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanäle am RPE (Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 1993) erklärt. An Neuronenzellen wurde ein solcher Effekt, über Phospholipase A2 (PLA2) vermittelt beschrieben (Yagami, et al. 2003a, Yagami, et al. 2003b, Yagami, et al. 2003c). MerTK kann prinzipiell Phospholipasen aktivieren (Ling, et al. 1995, Todt, et al. 2004) und PLA2 wurde im RPE nachgewiesen (Jacob, et al. 1996, 1997, Rodriguez de Turco, et al. 1992).

Beide angeführte Interpretationsversuche machen eine räumliche und zeitliche Regulation der Kalziumhomöostase per se deutlich. Im RCS RPE ist das vermutlich nicht mehr der Fall. Der vermehrte oder in der Regulation entkoppelte  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom führt somit zu einem verfrühtem Stoppsignal. Ein verfrühter unkontrollierter  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Anstieg könnte die Phagozytose über Proteinkinase C (PKC) inhibieren (Hall, et al. 1991b, Sheu, et al. 1994). Während die simultane Aktivierung von PKC und Tyrosinkinasen in nicht-dystrophischen Kontrollzellen den  $\text{Ca}^{2+}$  Einstrom durch L-Typkanäle unterbindet (Strauss, et al. 1997), wird beim RCS RPE dieser gesteigert (Smith-Thomas, et al. 2000). Eine anhaltende Wirkung von Nifedipin nach 12 Stunden Inkubation ist höchst unwahrscheinlich (Bottorff, et al. 1984), so dass zu diesem Zeitpunkt der initiale Effekt vorbei ist.

*Fall 2:* Desweiteren werden zahlreiche Gene auf die Stimulation durch extrazelluläre Liganden, wie Wachstumsfaktoren, die über Erhöhung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  oder anderen sekundären Botenstoffen agieren, reguliert. Wie in Kapitel 5.5.4 diskutiert wäre auch dadurch eine Phagozytosemodulation möglich.

### 5.5.3. Beteiligung von Proteintyrosinkinasen

Die ZYTOSOLISCHE TYROSINKINASE  $\text{pp60}^{\text{c-src}}$  Beteiligung an der Phagozytose von RPE Zellen wurde anhand der bisherigen Ergebnisse in der Interaktion von Phagozytoserezeptoren und L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanal diskutiert. Dabei scheint eine komplexe Feinregulation durch unterschiedliche sekundäre Botenstoffe inklusive  $\text{Ca}^{2+}$  involviert zu sein. Dass diese beim RCS RPE verändert ist, bestätigen auch die Unterschiede in der Phagozytosefunktion nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblockade.

In der Literatur konnte bisher gezeigt werden, dass nicht nur die  $\text{Ca}^{2+}$ -Stromdichte von Cav1.3 vergrößert und die Inaktivierungszeit verlängert ist, sondern auch die Regulation verändert. Im Gegensatz zu nicht-dystrophen RPE inhibiert die Aktivierung von PKC und Applikation von  $\text{pp60}^{\text{c-src}}$  die L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle an RCS-RPE Zellen. Das heißt, die Applikation von Herbimycin A inhibiert  $\text{pp60}^{\text{c-src}}$  und führt zur erhöhten Leitfähigkeit von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen. Ebenso führt die PKC Aktivierung in Kombination mit Tyrosinkinaseapplikation nicht zur Inhibierung, sondern zur Aktivierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen beim RCS RPE (Malecaze, et al. 1993, Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 1997, Strauss, et al. 2000). Dies könnte an der veränderten Expression von PKC Subtypen liegen (Wood, et al. 1998)

oder an der veränderten Kalziumhomöostase (Dufour, et al. 2003, Himpens, et al. 1999, Mergler, et al. 1998, Stalmans, et al. 1998, 1999, Strauss, et al. 1993, Strauss, et al. 1996, Strauss, et al. 1998a, Strauss, et al. 1998b).

Die hier durchgeführten Experimente zur Beteiligung der src Tyrosinkinase bestätigen dessen elementare Rolle auch bei der Phagozytose von RCS-RPE Zellen. Die Inhibierung von pp60<sup>c-src</sup> mit Herbimycin A führt am RCS RPE wie an Kontrollzellen zur Senkung der Phagozytose. Dabei stellt sich der reduzierende Serumeffekt additiv mit einer pp60<sup>c-src</sup> Inhibierung dar. Nach zwölf Stunden OS Applikationzeit unter pp60<sup>c-src</sup> Ausschaltung ist keine OS Aufnahme mehr zu verzeichnen. Der Effekt von HA am RCS RPE war effektiver als an den Kontrollzellen. Durch die veränderte Rolle von pp60<sup>c-src</sup> in der L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanalregulation (RCS RPE inhibierend, Kontroll RPE stimulierend) könnte man schlussfolgern, dass eine fein abgestimmte Regulation der Kanäle für den reibungslosen Ablauf der Phagozytose notwendig ist. Danach scheint ein zuviel oder zu wenig an einströmenden Ca<sup>2+</sup> zu einem oder mehreren bestimmten richtigen oder verkehrten Zeitpunkten möglicherweise die Phagozytose entweder ablaufen zu lassen oder zu terminieren. An sich entwickelnden Neuronen wurde gezeigt, dass ein länger anhaltender Einstrom durch L-Typ Ca<sup>2+</sup>-Kanäle eine Tyrosinphosphorylierung aktiviert, die einen Verlust der Filopodienstruktur induziert (Ramakers, et al. 2001, Schindelholz, et al. 2000). In einer frühen Arbeit konnte gezeigt werden, dass beim RCS RPE in vitro eine Pseudopodienstruktur basierend auf Aktinfilamenten nach OS Anbindung zu Stande kommt. In der Phase der fehlenden OS Aufnahme wurde jedoch eine ungleichmäßige und ungenügende Aktivierung der Pseudopodienbildung beobachtet (Chaitin, et al. 1983a).

Danach könnte die Erkennung der OS an  $\alpha\beta 5$  Integrinen einen Ca<sup>2+</sup> Einstrom über c-src Tyrosinkinasen aktivieren (Waitkus-Edwards, et al. 2002, Wu, et al. 2001), welcher bei der Pseudo-/Lamellipodiabildung involviert sein könnte (Matsumoto, et al. 1987). Erst kürzlich wurde die von  $\alpha\beta 5$  Integrin nach geschaltete Aktivierung von Rac-1 über die Fokale Adhäsionskinase (FAK) und Adapterprotein Grb2, Lyn und pp60<sup>c-src</sup> an RPE Zellen gezeigt (Finnemann 2002, 2004a, Nandrot, et al. 2003). Dabei werden Mitglieder der c-src Familie differenziert aktiviert. Bei verwandten Mechanismen in Neutrophilen konnte gezeigt werden, dass die Pseudopodienbildung von einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch spannungsabhängige Ionenkanäle abhängig ist (Roberts, et al. 1984).

#### 5.5.4. Einfluss des Wachstumsfaktor bFGF

DIE BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR (bFGF, FGF2) abhängige beschriebene Stimulation der OS Phagozytose nach 24 Stunden Vorinkubation konnte hier bestätigt werden. Dabei war eine Konzentrationsabhängigkeit zu beobachten, wenn die Phagozytose nach 4 Stunden gestoppt und ausgewertet wurde. Nach 12 Stunden scheint ein Maximum erreicht, da kein Konzentrationsunterschied mehr vorlag. Doch dabei es gab einen signifikanten Unterschied zu den Literaturdaten zu verzeichnen (McLaren, et al. 1997). Die Phagozytosesteigerung ging mit der Zunahme der Anbindungskapazität einher. Neben den schon beim bFGF Effekt auf nicht-dystrophes RPE diskutierten möglichen Hintergründen wäre noch Folgendes zu betrachten. Die hier gezeigten Versuche wurden mit bFGF in F99 Medium ohne Serum vorinkubiert und McLaren et al. haben MEM mit 5 % FCS benutzt.

Wie zuvor hier gezeigt und diskutiert, steigert Serum die Anbindung bei der Phagozytose von RCS-RPE Zellen. Das erklärt die Differenzen der Daten nicht. In dieser Arbeit wurden durchgängig porcine OS verwendet. Die besagten Literaturdaten wurden vollständig mit Ratten RPE und OS durchgeführt

(McLaren, et al. 1997). Da in einer vor kurzem veröffentlichte Studie erstmals Speziendifferenzen bei der Phagozytose beschrieben wurden sollte das berücksichtigt werden (Kindzelskii, et al. 2004). Für weitere Studien wäre ein einheitliches und vergleichendes Experimentdesign wünschenswert. Insbesondere bei Untersuchungen an humanen RPE Zellen. Die Verfügbarkeit frischer humaner Retinae ist gering, so dass für die Bereitstellung von OS oft frisches Material von Tieren verwendet werden muss. Trotz der wichtigen qualitativen Differenz der Anbindung kommt es insgesamt zu einer Steigerung der Phagozytose des RCS RPE. In den dargestellten Experimenten konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass auch eine bFGF Vorinkubation von 30 Minuten anstatt 24 Stunden zu diesem Effekt führt. Weiterhin wurde die bFGF Stimulation durch gleichzeitige pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinaseinhibierung nicht weiter reduziert als unter Kontrollbedingungen. An dieser Stelle zeigt sich abermals, dass der bFGF Einfluss unabhängig von der pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase ist.

Es konnte gezeigt werden, dass in nativen und in vitro RCS-RPE die bFGF Expression auf mRNA und Proteinebene reduziert ist (Malecaze, et al. 1993, McLaren, et al. 1996). In anderen Studien konnten diese Ergebnisse nicht reproduziert werden (Connolly, et al. 1992), aber dafür wurde eine reduzierte bFGF Expression der neuronalen Retina präsentiert (Rakoczy, et al. 1993). Desweiteren kann nach subretinaler bFGF Injektion eine Degeneration verzögert werden (Faktorovich, et al. 1990, 1992, Neuner-Jehle, et al. 2000, Ogata, et al. 1999, Schraermeyer, et al. 2000). Der Hintergrund des bFGF Effektes auf die Phagozytose ist noch nicht geklärt und der Zusammenhang mit der verzögerten retinalen Degeneration ebenfalls nicht. Nach in vivo Applikation konnte keine Zunahme der phagozytierten OS verzeichnet werden (Faktorovich, et al. 1990).

*Welche sekundären Botenstoffe könnten beim bFGF Effekt am RCS RPE involviert sein?*

Die Applikation von bFGF in RCS RPE Zellen in vitro führt zu keiner Änderung der cAMP Konzentration wie an Kontrollzellen (Nash, et al. 1995) und ist somit vermutlich kein Vermittler der Phagozytostimulation. Weiterhin aktivieren andere Ca<sup>2+</sup>-Kanalleitfähigkeiten als in Kontrollzellen (Rosenthal, et al. 2001). Denn eine an Kontrollzellen mit bFGF induzierte Zunahme der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Konzentration zeigte sich an RCS RPE nicht blockierbar mit Nifedipin (Mergler, et al. 1998). Es ist nicht geklärt, welche Ca<sup>2+</sup>-Leitfähigkeiten am bFGF bedingten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Anstieg in RCS-RPE beteiligt sind und wie die Aktivierung erfolgt. Durch diese unbekannte Kompensation des L-Typ Beitrags zur [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> Homöostase konnte mit den Phagozytoseversuchen an RCS RPE Zellen keine aufklärenden Erkenntnisse zum möglichen Zusammenhang mit der bFGF Wirkung ermittelt werden. Die Diversität der regulatorischen und funktionellen Änderungen durch die c-mer Mutation werden dadurch bestätigt.

### 5.5.5. Zusammenfassung: Kontroll-RPE versus RCS-RPE Phagozytose

Die in dieser Arbeit identifizierten Differenzen sind hier einmal kurz zusammengefasst (Tab. 3.2, Abb. 4.5 und detaillierte Tab. im Anhang 8.3).

- Die initiale Beobachtung stellte den schon in der Literatur beschriebenen divergenten Einfluss von fetalem Kälberserum (FCS) auf die Phagozytose von RCS-RPE im Vergleich zu Kontroll-RPE in vitro dar. Dieses Ergebnis validierte unter anderen das Phagozytosemesssystem. FCS ist die Hauptquelle von Protein S und Gas6 in vitro und führt so zur serumstimulierten Phagozytose nativer RPE Zellen (Hall, et al. 2005).
- Das MerTK defiziente RCS-RPE weist diesen Effekt nicht auf, sondern FCS führt zur weiteren signifikanten Reduktion der Phagozytose (Edwards, et al. 1986, Hall, et al. 1987, Mayerson, et al. 1986).
- Bei den Phagozytosemessungen an RPE Kontrollzellen stellte sich heraus, dass die Blockierung des Kalziumeinstromes durch L-Typ Kanäle die Phagozytoserate senkte (serumfrei als auch -stimuliert).
- An RCS-RPE Zellen hingegen, führte die Kanalblockierung zu einer Steigerung der Phagozytose. In beiden Fällen wurden Anbindung und Aufnahme signifikant moduliert. Am RCS-RPE fiel bei zusätzlicher FCS Zugabe die Aufnahmesteigerung geringer aus. Die essentielle Rolle einer veränderten Kalziumhomöostase bei dieser Form der Retinadegeneration wird so bestätigt (Dufour, et al. 2003, Neuner-Jehle, et al. 2000, Ogata, et al. 1999, Schraermeyer, et al. 2000).
- Es konnte gezeigt werden, dass die Phagozytose durch RPE Zellen von Proteintyrosinkinasen (PTK) reguliert wird. Eine Inhibierung der PTK führte zur Reduktion der OS Aufnahme. Dabei war unter serumfreien Bedingungen kein signifikanter Einfluss auf die Anbindung zu verzeichnen. Aber die serumstimulierte Zunahme beider Phagozytosephasen wurde vollständig ausgelöscht.
- Dieses konnte auch bezüglich der Anbindung an RCS-RPE Zellen gezeigt werden. Im Gegensatz zum Kontroll-RPE wurden beide Phasen der Phagozytose durch RCS-RPE Zellen auch unter FCS Freiheit verringert. Die pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinasen sind involviert in Prozesse der OS Anbindung und Aufnahme genauso wie auch die L-Typ Kalziumkanäle, welche im RPE durch pp60<sup>c-src</sup> aktiviert werden können (Mergler, et al. 1998, Strauss, et al. 2000).
- Bei den Untersuchungen zum Einfluss des Wachstumsfaktors bFGF stellte sich heraus, dass dieser auf die Phagozytose von Kontroll-RPE eine initial reduzierende Wirkung hat. Nach längerer OS Exposition war nur noch die Anbindung verringert. Für die RCS-RPE Zellen konnte indessen im Gegensatz gezeigt werden, dass bFGF die OS Phagozytoserate steigert.

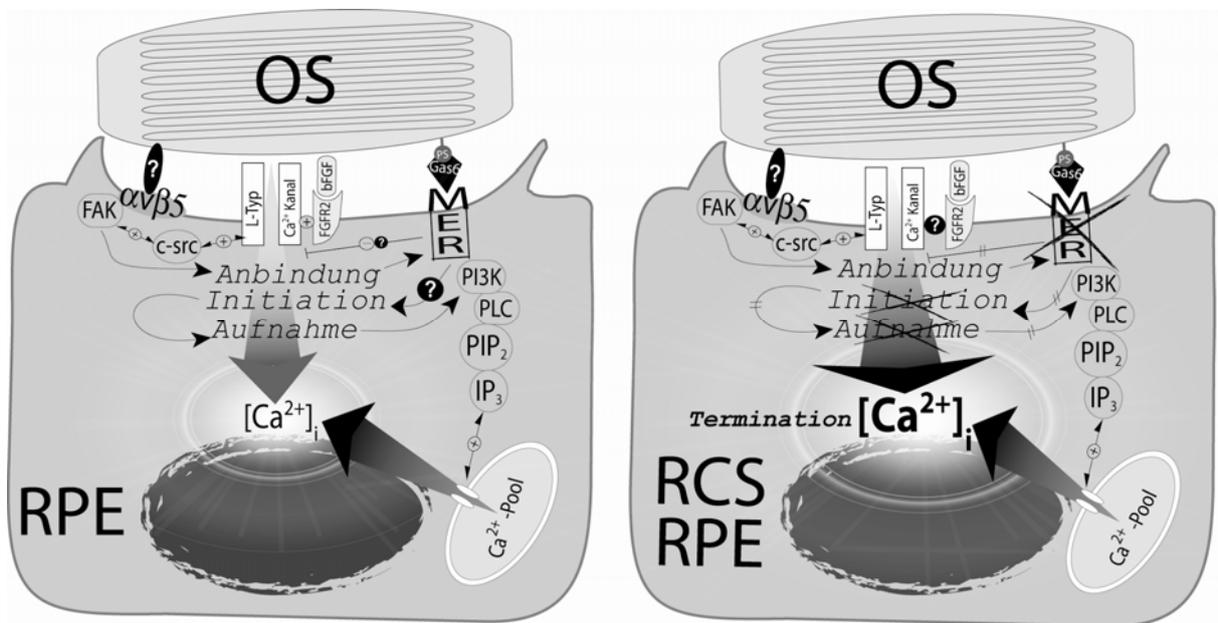


Abb. 4.5: Vereinfachtes Modells der Regulation der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) in Kontroll RPE versus MerTK defizientem RCS-RPE. Nach dem derzeitigen Stand der Literatur wird die Anbindung der OS durch  $\alpha\beta 5$  Integrine vermittelt. Dieser führt unter anderem zur Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK). Zytosolische Rezeptortyrosinkinase (pp60<sup>C-Src</sup>) können durch diese phosphoryliert und aktiviert werden. Die pp60<sup>C-Src</sup> kann L-Typ Kalziumkanäle des RPE aktivieren und so einen Kalziumeinstrom ermöglichen. Die intrazelluläre Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_i$  ist ein zentraler sekundärer Botenstoff im Phagozytoseprozess. Die Zunahme der  $[Ca^{2+}]_i$  assoziiert sowohl mit der Aktivierung als auch bei großer Zunahme der Termination der Phagozytose. Um während des Prozesses eine  $Ca^{2+}$  Homöostase zu gewährleisten wäre eine differenzierte Regulation dieser  $Ca^{2+}$  Kanäle notwendig. Fehlt wie im RCS RPE die MerTK weisen L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle eine erhöhte Leitfähigkeit auf. Möglicherweise fehlt die negative Rückkopplung in Form der bidirektionalen Kommunikation zwischen Anbindungs- ( $\alpha\beta 5$ ) und Aufnahmerezeptor (MerTK). MerTK könnte ein potentieller Inhibitor von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle darstellen. Fehlt dieser kommt es zur Fehlregulation in der  $Ca^{2+}$  Homöostase und somit zum vorzeitigen Ende des Phagozytoseprozesses.

## 6. Zusammenfassung

**D**ie wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit stellen 1) die Etablierung eines optimierten Phagozytoseassays zur Untersuchung mehrerer Variablen der Photorezeptoraußensegment (OS) Anbindung und Aufnahme, 2) die Validierung und Charakterisierung einer SV40 transfizierten humanen RPE Zelllinie hinsichtlich der Phagozytosefunktion in vitro, 3) die ausführliche Prüfung von Zellkulturmedien und komplexer Supplemente, letztere hergestellt aus der apikalen (Retinaextrakt) und basalen (choroideakonditioniertes Medium) Nachbarstruktur des RPE, auf die Phagozytose in vitro sowie 4) Untersuchungen zur Patho- /Physiologie der OS Phagozytose durch RPE und RCS-RPE Zellen dar.

- Serumfreie Zellkulturmedien beeinflussen die Phagozytose: hSFM > SFM > DMEM, MEM > F99.
- Choroideakonditioniertes Medium (ChCM) verringert die Phagozytose konzentrationsabhängig.
- Supplementierung mit 1 % Retinaextrakt steigert, aber 5 und 10 % mindern die Phagozytose.
- Supplementierung des Medium F99 mit 10 % FCS steigert, zusätzliches Insulin und Pyruvat verringert die Phagozytose. Weitere Zugabe von 15 % ChCM unterdrücken den Serumeffekt, wohingegen 1 % RE anstatt 15 % ChCM stimulierend wirkt.
- Es konnten verschiedene neue potentielle Teilnehmer an der Signaltransduktion der Phagozytose von Photorezeptoraußensegmenten (OS) des retinalen Pigmentepithel (RPE) identifiziert werden.
- Ferner wurden Daten an RPE Zellen der RCS-Ratte gewonnen, einem Tiermodell für eine auch beim Menschen beschriebene hereditäre Retinadegeneration bedingt durch Phagozytosedefekt des RPE. Der Vergleich nativer (Kontroll-RPE) und dystropher (RCS-RPE) Zellen gab neue Aufschlüsse über die Interaktion der modulierenden Signalpartner und außerdem weitere Einblicke in die Pathophysiologie dieser Retinadegeneration.
- MerTK und Gas6 werden im humanen RPE exprimiert. MerTK Antikörper reduzieren die Phagozytose und der die Phagozytose stimulierende Serumeinfluss ist nur partiell durch Gas6 vermittelt.
- Weiterhin konnte die Beteiligung von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen an der Phagozytose durch RPE Zellen beobachtet werden. Die Blockierung der Kanäle reduziert OS Anbindung und Aufnahme an Kontrollzellen. An RCS-RPE Zellen führt die Inhibierung der Kanäle zur Stimulation der Phagozytose.
- Zwei potentielle Modulatoren von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen am RPE, extrazellulär der Wachstumsfaktor bFGF und intrazellulär die pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinase, sind beteiligt an der Phagozytoseregulation.
- An RPE Kontrollzellen weist bFGF in Abhängigkeit der Applikationszeit und der OS Expositionzeit komplexe Effekte von inhibierender wie auch stimulierender Wirkung beider Phagozytosephasen auf. Die bFGF Applikation führt zur Stimulation der Phagozytose durch RCS-RPE Zellen.
- Die Inhibition von pp60<sup>c-src</sup> Tyrosinkinasen führt zum Verlust der serumstimulierten und –freien Phagozytose bei gleichzeitiger Reduktion der OS Anbindungskapazität durch RPE Kontrollzellen. Dieser Einfluss wurde auch an MerTK defizienten RCS-RPE Zellen ermittelt.
- Die hier dargestellten Ergebnisse deuten auf eine integrative Funktion von L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanälen an der Modulation der  $Ca^{2+}$  Homöostase hin. Diese ist bei einer Form der retinalen Degeneration aufgrund defizienter MerTK nicht mehr gewährleistet. Damit sind L-Typ  $Ca^{2+}$  Kanäle potentiell in Prozessen der Phagozytoseregulation in RPE Zellen involviert.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahmed, AA, Wahbi, AH and Nordlin, K (2001). "Neuropeptides modulate a murine monocyte/macrophage cell line capacity for phagocytosis and killing of *Leishmania major* parasites." *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23(3): 397-409.
- Ahmed, ZM, Riazuddin, S and Wilcox, ER (2003). "The molecular genetics of Usher syndrome." *Clin Genet* 63(6): 431-44.
- Akeo, K, Hiramitsu, T, Yorifuji, H and Okisaka, S (2002). "Membranes of retinal pigment epithelial cells in vitro are damaged in the phagocytotic process of the photoreceptor outer segment discs peroxidized by ferrous ions." *Pigment Cell Res* 15(5): 341-7.
- Alge, CS, Suppmann, S, Priglinger, SG, Neubauer, AS, May, CA, Hauck, S, Welge-Lussen, U, Ueffing, M and Kampik, A (2003). "Comparative proteome analysis of native differentiated and cultured dedifferentiated human RPE cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8): 3629-41.
- Algvere, PV, Gouras, P and Dørgård Kopp, E (1999). "Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD." *Eur J Ophthalmol* 9(3): 217-30.
- Algvere, PV and Seregård, S (2002). "Age-related maculopathy: pathogenetic features and new treatment modalities." *Acta Ophthalmol Scand* 80(2): 136-43.
- Alizadeh, M, Gelfman, CM, Bench, SR and Hjelmeland, LM (2000). "Expression and splicing of FGF receptor mRNAs during APRE-19 cell differentiation in vitro." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(8): 2357-62.
- Alizadeh, M, Miyamura, N, Handa, JT and Hjelmeland, LM (2003). "Human RPE cells express the FGFR2IIIc and FGFR3IIIc splice variants and FGF9 as a potential high affinity ligand." *Exp Eye Res* 76(2): 249-56.
- Ambati, J, Anand, A, Fernandez, S, Sakurai, E, Lynn, BC, Kuziel, WA, Rollins, BJ and Ambati, BK (2003). "An animal model of age-related macular degeneration in senescent *Ccl-2*- or *Ccr-2*-deficient mice." *Nat Med* 9(11): 1390-7.
- Angeillo-Scherrer, A, de Frutos, P, Aparicio, C, Melis, E, Savi, P, Lupu, F, Arnout, J, Dewerchin, M, Hoylaerts, M, Herbert, J, Collen, D, Dahlback, B and Carmeliet, P (2001). "Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis." *Nat Med* 7(2): 215-21.
- Aramant, RB and Seiler, MJ (2002). "Retinal transplantation--advantages of intact fetal sheets." *Prog Retin Eye Res* 21(1): 57-73.
- Aramant, RB and Seiler, MJ (2004). "Progress in retinal sheet transplantation." *Prog Retin Eye Res* 23(5): 475-94.
- Archer, FR, Doherty, P, Collins, D and Bolsover, SR (1999). "CAMs and FGF cause a local submembrane calcium signal promoting axon outgrowth without a rise in bulk calcium concentration." *Eur J Neurosci* 11(10): 3565-73.
- Basinger, S, Hoffman, R and Matthes, M (1976). "Photoreceptor shedding is initiated by light in the frog retina." *Science* 194(4269): 1074-6.
- Battista, PJ, Tilkins, ML, Judd, DA, Godwin, GP and Gorfien, SF (1994). "Serum-free media for the culture of Chinese hamster ovary cells." *Am Biotechnol Lab* 12(5): 64, 66, 68.
- Beauchemin, ML and Leuenberger, PM (1977). "Effects of colchicine on phagosome-lysosome interaction in retinal pigment epithelium. I. In vivo observations in albino rats." *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 203(3-4): 237-51.
- Becquet, F, Goureau, O, Soubrane, G, Coscas, G, Courtois, Y and Hicks, D (1994). "Superoxide inhibits proliferation and phagocytic internalization of photoreceptor outer segments by bovine retinal pigment epithelium in vitro." *Exp Cell Res* 212(2): 374-82.
- Bednarz, J, Teifel, M, Friedl, P and Engelmann, K (2000). "Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells." *Acta Ophthalmol Scand* 78(2): 130-6.
- Bednarz, J, Doubilei, V, Wollnik, PC and Engelmann, K (2001). "Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells." *Br J Ophthalmol* 85(12): 1416-20.
- Bellhorn, MB and Lewis, RK (1976). "Localization of ions in retina by secondary ion mass spectrometry." *Exp Eye Res* 22(5): 505-18.
- Ben-Tabou De-Leon, S, Blotnick, E and Nussinovitch, I (2003). "Effects of osmotic swelling on voltage-gated calcium channel currents in rat anterior pituitary cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 285(4): C840-52.
- Ben-Tabou De-Leon, S, Ben-Zeev, G and Nussinovitch, I (2005). "Effects of osmotic shrinkage on voltage-gated calcium channel currents in rat anterior pituitary cells." *Am J Physiol Cell Physiol*.
- Bengtsson, T, Jaconi, ME, Gustafson, M, Magnusson, KE, Theler, JM, Lew, DP and Stendahl, O (1993). "Actin dynamics in human neutrophils during adhesion and phagocytosis is controlled by changes in intracellular free calcium." *Eur J Cell Biol* 62(1): 49-58.
- Bergmann, M, Schutt, F, Holz, FG and Kopitz, J (2004). "Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Faseb J* 18(3): 562-4.
- Berridge, M, Lipp, P and Bootman, M (1999). "Calcium signalling." *Curr Biol* 9(5): R157-9.
- Berridge, MJ, Lipp, P and Bootman, MD (2000). "The versatility and universality of calcium signalling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.
- Berridge, MJ, Bootman, MD and Roderick, HL (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-29.
- Besch, D, Jägle, H, Scholl, HPN, Seeliger, MW and Zrenner, E (2003). "Inherited multifocal RPE-diseases: mechanisms for local dysfunction in global retinoid cycle defects." *Vis Res* 43: 3095-3108.
- Besharse, JC and Dunis, DA (1982). Rod photoreceptor disc shedding in vitro: inhibition by cytochalasin and activation of colchicine. *The Structure of the Eye*. Hollyfield, JG. New York, Elsevier Biomedical.
- Besharse, JC and Dunis, DA (1983). "Rod photoreceptor disc shedding in eye cups: relationship to bicarbonate and amino acids." *Exp Eye Res* 36(4): 567-79.

- Besharse, JC, Spratt, G and Forestner, DM (1986). "Light-evoked and kainic-acid-induced disc shedding by rod photoreceptors: differential sensitivity to extracellular calcium." *J Comp Neurol* 251(2): 185-97.
- Besharse, JC, Spratt, G and Reif-Lehrer, L (1988). "Effects of kynurenate and other excitatory amino acid antagonists as blockers of light- and kainate-induced retinal rod photoreceptor disc shedding." *J Comp Neurol* 274(2): 295-303.
- Besharse, JC and Defoe, D (1998). 8. Role of the retinal pigment epithelium in photoreceptor membrane turnover. *The Retinal Pigment Epithelium*. Marmor, MF and Wolfensberger, T.J. Oxford University Press.
- Bikfalvi, A, Savona, C, Perollet, C and Javerzat, S (1998). "New insights in the biology of fibroblast growth factor-2." *Angiogenesis* 1(2): 155-73.
- Bird, A (1996). "Age-related macular disease." *Br J Ophthalmol* 80(1): 2-3.
- Blanks, JC, Pickford, MS and Organisciak, DT (1992). "Ascorbate treatment prevents accumulation of phagosomes in RPE in light damage." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(10): 2814-21.
- Bok, D and Hall, MO (1971). "The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat." *J Cell Biol* 49(3): 664-82.
- Bok, D (1985). "Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26(12): 1659-94.
- Bootman, MD and Berridge, MJ (1995). "The elemental principles of calcium signaling." *Cell* 83(5): 675-8.
- Bootman, MD, Collins, TJ, Peppiatt, CM, Prothero, LS, MacKenzie, L, De Smet, P, Travers, M, Tovey, SC, Seo, JT, Berridge, MJ, Ciccolini, F and Lipp, P (2001a). "Calcium signalling--an overview." *Semin Cell Dev Biol* 12(1): 3-10.
- Bootman, MD, Lipp, P and Berridge, MJ (2001b). "The organisation and functions of local Ca(2+) signals." *J Cell Sci* 114(Pt 12): 2213-22.
- Bost, LM, Aotaki-Keen, AE and Hjelmeland, LM (1992). "Coexpression of FGF-5 and bFGF by the retinal pigment epithelium in vitro." *Exp Eye Res* 55(5): 727-34.
- Bottenstein, J, Hayashi, I, Hutchings, S, Masui, H, Mather, J, McClure, DB, Ohasa, S, Rizzino, A, Sato, G, Serrero, G, Wolfe, R and Wu, R (1979a). "The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media." *Methods Enzymol* 58: 94-109.
- Bottenstein, JE and Sato, GH (1979b). "Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(1): 514-7.
- Bottorff, MB, Graves, DA, McAllister, RG, Batenhorst, RL and Foster, TS (1984). "Nifedipine stability in cardioplegic solution." *Am J Hosp Pharm* 41(10): 2068-70.
- Boulton, M, Marshall, J and Mellerio, J (1984). "Retinitis pigmentosa: a quantitative study of the apical membrane of normal and dystrophic human retinal pigment epithelial cells in tissue culture in relation to phagocytosis." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221(5): 214-29.
- Boulton, M (1991). Ageing of the retinal pigment epithelium. *Progress in retinal research*. Osborne, NN and Chader, GJ. Oxford New York, Pergamon Press. 125-51.
- Boulton, M, Moriarty, P, Jarvis-Evans, J and Marcyniuk, B (1994). "Regional variation and age-related changes of lysosomal enzymes in the human retinal pigment epithelium." *Br J Ophthalmol* 78(2): 125-9.
- Boulton, M (1998). The role of melanin in the RPE. *The retinal pigment epithelium*. Marmor, MF and Wolfensberger, T.J. Oxford, Oxford University Press. 68-65.
- Boulton, M, Roanowska, M and Wess, T (2004). "Ageing of the retinal pigment epithelium: implications for transplantation." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(1): 76-84.
- Boulton, M, Dayhaw-Barker, P. (2001). "The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes." *Eye* 15: 384-389.
- Bourne, MC, Campell, DA and Tansley, K (1938). "Hereditary degeneration of rat retina." *Brit J Ophthalmol* 22: 613-623.
- Bourne, MC and Grüneberg, H (1939). "Degeneration of the retina and cataract." *J. Hered.* (30): 130-136.
- Boxer, LA, Baehner, RL and Davis, J (1977). "The effect of 2-deoxyglucose on guinea pig polymorphonuclear leukocyte phagocytosis." *J Cell Physiol* 91(1): 89-102.
- Boyle, D, Tien, LF, Cooper, NG, Shepherd, V and McLaughlin, BJ (1991). "A mannose receptor is involved in retinal phagocytosis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(5): 1464-70.
- Bradford, MM (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Bronstein, JM, Wasterlain, CG, Bok, D, Lasher, R and Farber, DB (1988). "Localization of retinal calmodulin kinase." *Exp Eye Res* 47(3): 391-402.
- Bryckaert, M, Guillonnet, X, Hecquet, C, Courtois, Y and Mascarelli, F (1999). "Both FGF1 and bcl-x synthesis are necessary for the reduction of apoptosis in retinal pigmented epithelial cells by FGF2: role of the extracellular signal-regulated kinase 2." *Oncogene* 18(52): 7584-93.
- Burke, JM and Twining, SS (1988). "Regional comparisons of cathepsin D activity in bovine retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(12): 1789-93.
- Burke, JM, Skumatz, CM, Irving, PE and McKay, BS (1996). "Phenotypic heterogeneity of retinal pigment epithelial cells in vitro and in situ." *Exp Eye Res* 62(1): 63-73.
- Burnside, B and Laties, AM (1976). "Actin filaments in apical projections of the primate pigmented epithelial cell." *Invest Ophthalmol* 15(7): 570-5.
- Burnside, MB (1976). "Possible roles of microtubules and actin filaments in retinal pigmented epithelium." *Exp Eye Res* 23(2): 257-75.
- Callaghan, B, Koh, SD and Keef, KD (2004). "Muscarinic M2 receptor stimulation of Cav1.2b requires phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C, and c-Src." *Circ Res* 94(5): 626-33.
- Carafoli, E, Santella, L, Branca, D and Brini, M (2001). "Generation, control, and processing of cellular calcium signals." *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36(2): 107-260.

- Chaitin, MH and Hall, MO (1983a). "The distribution of actin in cultured normal and dystrophic rat pigment epithelial cells during the phagocytosis of rod outer segments." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(7): 821-31.
- Chaitin, MH and Hall, MO (1983b). "Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(7): 812-20.
- Chaitin, MH, Schneider, BG, Hall, MO and Papermaster, DS (1984). "Actin in the photoreceptor connecting cilium: immunocytochemical localization to the site of outer segment disk formation." *J Cell Biol* 99(1 Pt 1): 239-47.
- Chang, CW, Ye, L, Defoe, DM and Caldwell, RB (1997). "Serum inhibits tight junction formation in cultured pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(6): 1082-93.
- Chen, C, Li, Q, Darrow, AL, Wang, Y, Derian, CK, Yang, J, de Garavilla, L, Andrade-Gordon, P and Damiano, BP (2004). "Mer receptor tyrosine kinase signaling participates in platelet function." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(6): 1118-23.
- Chen, J, Carey, K and Godowski, PJ (1997). "Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation." *Oncogene* 14(17): 2033-9.
- Cheng, S, Mao, J and Rehder, V (2000). "Filopodial behavior is dependent on the phosphorylation state of neuronal growth cones." *Cell Motil Cytoskeleton* 47(4): 337-50.
- Cheng, S, Geddis, MS and Rehder, V (2002). "Local calcium changes regulate the length of growth cone filopodia." *J Neurobiol* 50(4): 263-75.
- Church, PJ and Stanley, EF (1996). "Single L-type calcium channel conductance with physiological levels of calcium in chick ciliary ganglion neurons." *J Physiol* 496 (Pt 1): 59-68.
- Cibulsky, SM and Sather, WA (1999). "Block by ruthenium red of cloned neuronal voltage-gated calcium channels." *J Pharmacol Exp Ther* 289(3): 1447-53.
- Coffey, PJ, Girman, S, Wang, SM, Hetherington, L, Keegan, DJ, Adamson, P, Greenwood, J and Lund, RD (2002). "Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation." *Nat Neurosci* 5(1): 53-6.
- Cohen, PL, Caricchio, R, Abraham, V, Camenisch, TD, Jennette, JC, Roubey, RA, Earp, HS, Matsushima, G and Reap, EA (2002). "Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase." *J Exp Med* 196(1): 135-40.
- Conley, EC and Brammar, WJ (1999). *The Ion Channel Facts Book IV - Voltage Gated Ion Channel*. London, UK, Academic Press.
- Connolly, SE, Hjelmeland, LM and LaVail, MM (1992). "Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in mature and developing retinas of normal and RCS rats." *Curr Eye Res* 11(10): 1005-17.
- Cornell, RP and McClellan, CC (1982). "Modulation of hepatic reticuloendothelial system phagocytosis by pancreatic hormones." *J Reticuloendothel Soc* 32(6): 397-407.
- Coulombe, JN and Nishi, R (1991). "Stimulation of somatostatin expression in developing ciliary ganglion neurons by cells of the choroid layer." *J Neurosci* 11(2): 553-62.
- Coulombe, JN, Schwall, R, Parent, AS, Eckenstein, FP and Nishi, R (1993). "Induction of somatostatin immunoreactivity in cultured ciliary ganglion neurons by activin in choroid cell-conditioned medium." *Neuron* 10(5): 899-906.
- Custer, NV and Bok, D (1975). "Pigment epithelium-photoreceptor interactions in the normal and dystrophic rat retina." *Exp Eye Res* 21(2): 153-66.
- D'Amico, DJ, Dryja, TP, Tyo, MA, Craft, JL and Albert, DM (1982). "Mass cultivation of bovine ocular pigment epithelial cells in microcarrier suspension culture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23(3): 332-9.
- D'Cruz, PM, Yasumura, D, Weir, J, Matthes, MT, Abderrahim, H, LaVail, MM and Vollrath, D (2000). "Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MerTK in the retinal dystrophic RCS rat." *Hum Mol Genet* 9(4): 645-51.
- Daemen, FJ (1973). "Vertebrate rod outer segment membranes." *Biochim Biophys Acta* 300(3): 255-88.
- Dahlback, B and Stenflo, J (1981). "High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(4): 2512-6.
- Davidorf, FH, Mendlovic, DB, Bowyer, DW, Gresak, PM, Foreman, BC, Werling, KT and Chambers, RB (1991). "Pathogenesis of retinal dystrophy in the Royal College of Surgeons rat." *Ann Ophthalmol* 23(3): 87-94.
- Davis, AA, Bernstein, PS, Bok, D, Turner, J, Nachtigal, M and Hunt, RC (1995). "A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(5): 955-64.
- Defoe, DM, Matsumoto, B and Besharse, JC (1989). "Cytochalasin D inhibits L-glutamate-induced disc shedding without altering L-glutamate-induced increase in adhesiveness." *Exp Eye Res* 48(5): 641-52.
- Defoe, DM, Matsumoto, B and Besharse, JC (1992). "Reconstitution of the photoreceptor-pigment epithelium interface: L-glutamate stimulation of adhesive interactions and rod disc shedding after recombination of dissociated *Xenopus laevis* eyecups." *Exp Eye Res* 54(6): 903-11.
- Del Monte, MA, Rabbani, R, Diaz, TC, Lattimer, SA, Nakamura, J, Brennan, MC and Greene, DA (1991). "Sorbitol, myo-inositol, and rod outer segment phagocytosis in cultured hRPE cells exposed to glucose. In vitro model of myo-inositol depletion hypothesis of diabetic complications." *Diabetes* 40(10): 1335-45.
- Dewitt, S and Hallett, MB (2002). "Cytosolic free Ca(2+) changes and calpain activation are required for beta integrin-accelerated phagocytosis by human neutrophils." *J Cell Biol* 159(1): 181-9.
- Di, A, Krupa, B and Nelson, DJ (2001). "Calcium-G protein interactions in the regulation of macrophage secretion." *J Biol Chem* 276(40): 37124-32.
- Di, A, Krupa, B, Bindokas, VP, Chen, Y, Brown, ME, Palfrey, HC, Naren, AP, Kirk, KL and Nelson, DJ (2002). "Quantal release of free radicals during exocytosis of phagosomes." *Nat Cell Biol* 4(4): 279-85.
- Di, A, Nelson, DJ, Bindokas, V, Brown, ME, Libunao, F and Palfrey, HC (2003). "Dynamin regulates focal exocytosis in phagocytosing macrophages." *Mol Biol Cell* 14(5): 2016-28.
- Dintelmann, TS, Heimann, K, Kayatz, P and Schraermeyer, U (1999). "Comparative study of ROS degradation by IPE and RPE cells in vitro." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(10): 830-9.
- Dmitriev, AV, Govardovskii, VI, Schwahn, HN and Steinberg, RH (1999). "Light-induced changes of extracellular ions and volume in the isolated chick retina-pigment epithelium preparation." *Vis Neurosci* 16(6): 1157-67.

- Dorey, CK, Wu, G, Ebenstein, D, Garsd, A and Weiter, JJ (1989). "Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(8): 1691-9.
- Dornonville de la Cour, M (1993). "Ion transport in the retinal pigment epithelium. A study with double barrelled ion-selective microelectrodes." *Acta Ophthalmol Suppl* (209): 1-32.
- Dobilei, V, Bednarz, J, Valtink, M, Zubaty, V, Karl, MO, Engelmann, K and Schaefer, H (2002). "Serum-Free Cultivation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells for Transplantation." *ARVO Meeting Abstracts* 43(12): 3450-.
- Dowling, JE and Sidman, RL (1962). "Inherited retinal dystrophy in the rat." *J Cell Biol* 14: 73-109.
- Dufour, EM, Nandrot, E, Marchant, D, Van Den Berghe, L, Gadin, S, Issilame, M, Dufier, JL, Marsac, C, Carper, D, Menasche, M and Abitbol, M (2003). "Identification of novel genes and altered signaling pathways in the retinal pigment epithelium during the Royal College of Surgeons rat retinal degeneration." *Neurobiol Dis* 14(2): 166-80.
- Dulbecco, R and Freeman, G (1959). "Plaque production by the polyoma virus." *Virology* 8(3): 396-7.
- Duncan, JL, LaVail, MM, Yasumura, D, Matthes, MT, Yang, H, Trautmann, N, Chappelow, AV, Feng, W, Earp, HS, Matsushima, GK and Vollrath, D (2003a). "An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2): 826-38.
- Duncan, JL, Yang, H, Vollrath, D, Yasumura, D, Matthes, MT, Trautmann, N, Chappelow, AV, Feng, W, Earp, HS, Matsushima, GK and LaVail, MM (2003b). "Inherited retinal dystrophy in Mer knockout mice." *Adv Exp Med Biol* 533: 165-72.
- Dunn, KC, Aotaki-Keen, AE, Putkey, FR and Hjelmeland, LM (1996). "ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties." *Exp Eye Res* 62(2): 155-69.
- Dutt, K, Harris-Hooker, S, Ellerson, D, Layne, D, Kumar, R and Hunt, R (2003). "Generation of 3D retina-like structures from a human retinal cell line in a NASA bioreactor." *Cell Transplant* 12(7): 717-31.
- Eagle, H (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures." *Science* 130(3373): 432-7.
- Edwards, AO, Ritter, R, 3rd, Abel, KJ, Manning, A, Panhuysen, C and Farrer, LA (2005). "Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration." *Science* 308(5720): 421-4.
- Edwards, RB (1977). "Culture of rat retinal pigment epithelium." *In Vitro* 13(5): 301-4.
- Edwards, RB and Szamier, RB (1977). "Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture." *Science* 197(4307): 1001-3.
- Edwards, RB and Bakshian, S (1980). "Phagocytosis of outer segments by cultured rat pigment epithelium. Reduction by cyclic AMP and phosphodiesterase inhibitors." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19(10): 1184-8.
- Edwards, RB and Flaherty, PM (1986). "Increased phagocytosis of outer segments in the presence of serum by cultured normal, but not dystrophic, rat retinal pigment epithelium." *J Cell Physiol* 127(2): 293-6.
- Edwards, RB (1991). "Stimulation of rod outer segment phagocytosis by serum occurs only at the RPE apical surface." *Exp Eye Res* 53(2): 229-32.
- Engelmann, K and Valtink, M (2004). "RPE cell cultivation." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(1): 65-7.
- Eudy, JD and Sumegi, J (1999). "Molecular genetics of Usher syndrome." *Cell Mol Life Sci* 56(3-4): 258-67.
- Faccio, R, Grano, M, Colucci, S, Zallone, AZ, Quaranta, V and Pelletier, AJ (1998). "Activation of alpha v beta 3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin." *Biochem Biophys Res Commun* 249(2): 522-5.
- Faktorovich, EG, Steinberg, RH, Yasumura, D, Matthes, MT and LaVail, MM (1990). "Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor." *Nature* 347(6288): 83-6.
- Faktorovich, EG, Steinberg, RH, Yasumura, D, Matthes, MT and LaVail, MM (1992). "Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat." *J Neurosci* 12(9): 3554-67.
- Fay, SP, Habbersett, R, Domalewski, MD, Posner, RG, Houghton, TG, Pierson, E, Muthukumaraswamy, N, Whitaker, J, Haugland, RP, Freer, RJ and et al. (1994). "Multiparameter flow cytometric analysis of a pH sensitive formyl peptide with application to receptor structure and processing kinetics." *Cytometry* 15(2): 148-53.
- Feng, W, Yasumura, D, Matthes, MT, LaVail, MM and Vollrath, D (2002). "Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells." *J Biol Chem* 277(19): 17016-22.
- Feng, W, Zheng, JJ, Lutz, DA and McLaughlin, BJ (2003). "Loss of RPE phenotype affects phagocytic function." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 241(3): 232-40.
- Fera, E, O'Neil, C, Lee, W, Li, S and Pickering, JG (2004). "Fibroblast growth factor-2 and remodeled type I collagen control membrane protrusion in human vascular smooth muscle cells: biphasic activation of Rac1." *J Biol Chem* 279(34): 35573-82.
- Finnemann, SC, Bonilha, VL, Marmorstein, AD and Rodriguez-Boulan, E (1997a). "Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12932-7.
- Finnemann, SC, Marmorstein, AD, Neill, JM and Rodriguez-Boulan, E (1997b). "Identification of the retinal pigment epithelium protein RET-PE2 as CE-9/OX-47, a member of the immunoglobulin superfamily." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(11): 2366-74.
- Finnemann, SC and Rodriguez-Boulan, E (1999). "Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins, and protein kinase C regulates alpha v beta 5 binding and cytoskeletal linkage." *J Exp Med* 190(6): 861-74.
- Finnemann, SC and Silverstein, RL (2001). "Differential roles of CD36 and alpha v beta 5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium." *J Exp Med* 194(9): 1289-98.
- Finnemann, SC (2002). "Photoreceptor Outer Segment Phagocytosis By The Retinal Pigment Epithelium Requires Focal Adhesion Kinase Activation." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43(12): 2901-.
- Finnemann, SC, Leung, LW and Rodriguez-Boulan, E (2002). "The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 3842-7.

- Finnemann, SC (2003a). "Role of alphavbeta5 integrin in regulating phagocytosis by the retinal pigment epithelium." *Adv Exp Med Biol* 533: 337-42.
- Finnemann, SC (2003b). "Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors." *Embo J* 22(16): 4143-54.
- Finnemann, SC (2004a). "Signaling mechanisms regulating photoreceptor outer segment phagocytosis by the retinal pigment epithelium." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(5): 3677-.
- Finnemann, SC (2004b). "Comment on 'Integrin alphavbeta is not required for the phagocytosis of photoreceptor outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells' by M.O. Hall, T.A. Abrams and B.L. Burgess [Exp. Eye Res. 77 (2003) 281-286]." *Exp Eye Res* 78(2): 309-10; author reply 311-2.
- Fishman, ML, Oberc, MA, Hess, HH and Engel, WK (1977). "Ultrastructural demonstration of calcium in retina, retinal pigment epithelium and choroid." *Exp Eye Res* 24(4): 341-53.
- Fragoso, G and Lopez-Colome, AM (1999). "Excitatory amino acid-induced inositol phosphate formation in cultured retinal pigment epithelium." *Vis Neurosci* 16(2): 263-9.
- Freddo, TF (1984). "Intercellular junctions of the iris epithelia in *Macaca mulatta*." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25(9): 1094-104.
- Fukazawa, H, Mizuno, S and Uehara, Y (1990). "Effects of herbimycin A and various SH-reagents on p60v-src kinase activity in vitro." *Biochem Biophys Res Commun* 173(1): 276-82.
- Fukazawa, H, Li, PM, Yamamoto, C, Murakami, Y, Mizuno, S and Uehara, Y (1991). "Specific inhibition of cytoplasmic protein tyrosine kinases by herbimycin A in vitro." *Biochem Pharmacol* 42(9): 1661-71.
- Funakoshi, H, Yonemasu, T, Nakano, T, Matumoto, K and Nakamura, T (2002). "Identification of Gas6, a putative ligand for Sky and Axl receptor tyrosine kinases, as a novel neurotrophic factor for hippocampal neurons." *J Neurosci Res* 68(2): 150-60.
- Gal, A, Li, Y, Thompson, DA, Weir, J, Orth, U, Jacobson, SG, Apfelstedt-Sylla, E and Vollrath, D (2000). "Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa." *Nat Genet* 26(3): 270-1.
- Gall, CM, Pinkstaff, JK, Lauterborn, JC, Xie, Y and Lynch, G (2003). "Integrins regulate neuronal neurotrophin gene expression through effects on voltage-sensitive calcium channels." *Neuroscience* 118(4): 925-40.
- Gallemore, RP, Griff, ER and Steinberg, RH (1988). "Evidence in support of a photoreceptor origin for the "light-peak substance"." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(4): 566-71.
- Gallemore, RP, Li, JD, Govardovskii, VI and Steinberg, RH (1994). "Calcium gradients and light-evoked calcium changes outside rods in the intact cat retina." *Vis Neurosci* 11(4): 753-61.
- Gao, H and Hollyfield, JG (1992). "Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(1): 1-17.
- Gelfman, CM, Kelleher, CM and Hjelmeland, LM (1998). "Differentiation of retinal pigment epithelial cells in vitro uncovers silencer activity in the FGF-5 gene promoter." *Exp Eye Res* 67(2): 151-62.
- Geng, L, Wihlmark, U and Algreve, PV (1999). "Lipofuscin accumulation in iris pigment epithelial cells exposed to photoreceptor outer segments." *Exp Eye Res* 69(5): 539-46.
- Gibbs, D, Kitamoto, J and Williams, DS (2003). "Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(11): 6481-6.
- Godchaux, W, 3rd and Zimmerman, WF (1979). "Soluble proteins of intact bovine rod cell outer segments." *Exp Eye Res* 28(4): 483-500.
- Godowski, PJ, Mark, MR, Chen, J, Sadick, MD, Raab, H and Hammonds, RG (1995). "Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3." *Cell* 82(3): 355-8.
- Goldman, AI and O'Brien, PJ (1978). "Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat." *Science* 201(4360): 1023-5.
- Goldman, AI, O'Brien, PJ, Masterson, E, Israel, P, Teirstein, P and Chader, G (1979). "A quantitative system for studying phagocytosis in pigment epithelium tissue culture." *Exp Eye Res* 28(4): 455-67.
- Gomes, P, Malfait, M, Himpens, B and Vereecke, J (2003). "Intercellular Ca(2+)-transient propagation in normal and high glucose solutions in rat retinal epithelial (RPE-J) cells during mechanical stimulation." *Cell Calcium* 34(2): 185-92.
- Gomez, TM, Robles, E, Poo, M and Spitzer, NC (2001). "Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning." *Science* 291(5510): 1983-7.
- Gouras, P, Lopez, R, Kjeldbye, H, Sullivan, B and Brittis, M (1989). "Transplantation of retinal epithelium prevents photoreceptor degeneration in the RCS rat." *Prog Clin Biol Res* 314: 659-71.
- Gouras, P, Du, J, Gelanze, M, Kwun, R, Kjeldbye, H and Lopez, R (1991). "Transplantation of photoreceptors labeled with tritiated thymidine into RCS rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(5): 1704-7.
- Grabham, PW, Reznik, B and Goldberg, DJ (2003). "Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones." *J Cell Sci* 116(Pt 18): 3739-48.
- Graham, DK, Dawson, TL, Mullaney, DL, Snodgrass, HR and Earp, HS (1994). "Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer." *Cell Growth Differ* 5(6): 647-57.
- Greenberger, LM and Besharse, JC (1983). "Photoreceptor disc shedding in eye cups. Inhibition by deletion of extracellular divalent cations." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(11): 1456-64.
- Greenberger, LM and Besharse, JC (1985). "Stimulation of photoreceptor disc shedding and pigment epithelial phagocytosis by glutamate, aspartate, and other amino acids." *J Comp Neurol* 239(4): 361-72.
- Gregory, CY, Converse, CA and Foulds, WS (1991). "Specific radioimmunoassay to investigate rod outer segment phagocytosis by retinal pigment epithelium in vitro." *Ophthalmic Res* 23(4): 171-6.
- Gregory, CY, Abrams, TA and Hall, MO (1992). "cAMP production via the adenylyl cyclase pathway is reduced in RCS rat RPE." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(11): 3121-4.
- Gregory, CY, Abrams, TA and Hall, MO (1994). "Stimulation of A2 adenosine receptors inhibits the ingestion of photoreceptor outer segments by retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(3): 819-25.

- Grisanti, S, Szurman, P, Jordan, J, Kociok, N, Bartz-Schmidt, KU and Heimann, K (2002). "Xenotransplantation of retinal pigment epithelial cells into RCS rats." *Jpn J Ophthalmol* 46(1): 36-44.
- Grissmer, S, Nguyen, AN, Aiyar, J, Hanson, DC, Mather, RJ, Gutman, GA, Karmilowicz, MJ, Auperin, DD and Chandy, KG (1994). "Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines." *Mol Pharmacol* 45(6): 1227-34.
- Guillonneau, X, Regnier-Ricard, F, Dupuis, C, Courtois, Y and Mascarelli, F (1997). "FGF2-stimulated release of endogenous FGF1 is associated with reduced apoptosis in retinal pigmented epithelial cells." *Exp Cell Res* 233(1): 198-206.
- Guillonneau, X, Regnier-Ricard, F, Dupuis, C, Courtois, Y and Mascarelli, F (1998). "Paracrine effects of phosphorylated and excreted FGF1 by retinal pigmented epithelial cells." *Growth Factors* 15(2): 95-112.
- Hackett, SF, Schoenfeld, CL, Freund, J, Gottsch, JD, Bhargava, S and Campochiaro, PA (1997). "Neurotrophic factors, cytokines and stress increase expression of basic fibroblast growth factor in retinal pigmented epithelial cells." *Exp Eye Res* 64(6): 865-73.
- Hackshaw, KV and Shi, Y (1994). "Fibroblast growth factors mobilize peritoneal macrophage intracellular calcium." *Life Sci* 54(10): 661-70.
- Haines, JL, Hauser, MA, Schmidt, S, Scott, WK, Olson, LM, Gallins, P, Spencer, KL, Kwan, SY, Noureddine, M, Gilbert, JR, Schnetz-Boutaud, N, Agarwal, A, Postel, EA and Pericak-Vance, MA (2005). "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." *Science* 308(5720): 419-21.
- Haley, JE, Flood, MT, Gouras, P and Kjeldbye, HM (1983). "Proteins from human retinal pigment epithelial cells: evidence that a major protein is actin." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(7): 803-11.
- Hall, MO (1978). "Phagocytosis of light- and dark-adapted rod outer segments by cultured pigment epithelium." *Science* 202(4367): 526-8.
- Hall, MO and Abrams, T (1987). "Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells." *Exp Eye Res* 45(6): 907-22.
- Hall, MO and Abrams, TA (1991a). "The phagocytosis of ROS by RPE cells is not inhibited by mannose-containing ligands." *Exp Eye Res* 53(2): 167-70.
- Hall, MO, Abrams, TA and Mittag, TW (1991b). "ROS ingestion by RPE cells is turned off by increased protein kinase C activity and by increased calcium." *Exp Eye Res* 52(5): 591-8.
- Hall, MO, Abrams, TA and Mittag, TW (1993). "The phagocytosis of rod outer segments is inhibited by drugs linked to cyclic adenosine monophosphate production." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(8): 2392-401.
- Hall, MO, Burgess, BL, Abrams, TA, Ershov, AV and Gregory, CY (1996a). "Further studies on the identification of the phagocytosis receptor of rat retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 63(3): 255-64.
- Hall, MO, Burgess, BL, Abrams, TA and Martinez, MO (1996b). "Carbachol does not correct the defect in the phagocytosis of outer segments by Royal College of Surgeons rat retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(7): 1473-7.
- Hall, MO, Abrams, TA, Burgess, BL and Ershov, AV (1997). Further studies on the phagocytosis of photoreceptor outer segments by rat retinal pigment epithelial cells. *Degenerative Retinal Diseases*. LaVail, MM, Hollyfield, JG and Anderson, DH. New York, Plenum. 391-397.
- Hall, MO, Prieto, AL, Obin, MS, Abrams, TA, Burgess, BL, Heeb, MJ and Agnew, BJ (2001). "Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6." *Exp Eye Res* 73(4): 509-20.
- Hall, MO, Obin, MS, Prieto, AL, Burgess, BL and Abrams, TA (2002). "Gas6 Binding to Photoreceptor Outer Segments Requires gamma-Carboxyglutamic Acid (Gla) and Ca<sup>2+</sup> and is Required for OS Phagocytosis by RPE Cells in vitro." *Exp Eye Res* 75(4): 391.
- Hall, MO, Abrams, TA and Burgess, BL (2003a). "Integrin alphavbeta5 is not required for the phagocytosis of photoreceptor outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 77(3): 281-6.
- Hall, MO, Agnew, BJ, Abrams, TA and Burgess, BL (2003b). "The phagocytosis of os is mediated by the PI3-kinase linked tyrosine kinase receptor, mer, and is stimulated by GAS6." *Adv Exp Med Biol* 533: 331-6.
- Hall, MO, Obin, MS, Heeb, MJ, Burgess, BL and Abrams, TA (2005). "Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res*.
- Ham, RG and W.L., M (1979). Media and growth requirements. In: *Methods in Enzymology*; Vol LVIII; pp 44-93; Academic Press; New York.
- Hartmann, U, Sistani, F and Steinhorst, UH (1999). "Human and porcine anterior lens capsule as support for growing and grafting retinal pigment epithelium and iris pigment epithelium." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(11): 940-5.
- Haruta, M, Sasai, Y, Kawasaki, H, Amemiya, K, Ooto, S, Kitada, M, Suemori, H, Nakatsuji, N, Ide, C, Honda, Y and Takahashi, M (2004). "In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(3): 1020-5.
- Haruta, M (2005). "Embryonic stem cells: potential source for ocular repair." *Semin Ophthalmol* 20(1): 17-23.
- Hasson, T (1999). "Molecular motors: sensing a function for myosin-VIIa." *Curr Biol* 9(22): R838-41.
- Hato, T, Oda, A, Ozaki, Y, Minamoto, Y, Nakatani, S, Watanabe, A, Kume, S, Ikeda, Y and Fujita, S (1997). "Outside-in signaling from integrin alpha IIb beta 3 into platelets in the absence of agonist-induced signaling." *Int J Hematol* 65(4): 385-95.
- Hayashi, A, Nakae, K, Naka, H, Ohji, M and Tano, Y (1996). "Cytokine effects on phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells of normal and dystrophic rats." *Curr Eye Res* 15(5): 487-99.
- Heath, AR and Basinger, SF (1983). "Simple sugars inhibit rod outer segment disc shedding by the frog retina." *Vision Res* 23(12): 1371-7.
- Hecquet, C, Lefevre, G, Valtink, M, Engelmann, K and Mascarelli, F (2002a). "cAMP inhibits the proliferation of retinal pigmented epithelial cells through the inhibition of ERK1/2 in a PKA-independent manner." *Oncogene* 21(39): 6101-12.
- Hecquet, C, Lefevre, G, Valtink, M, Engelmann, K and Mascarelli, F (2002b). "Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelial cells: ERK and RPE cell proliferation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9): 3091-8.
- Hecquet, C, Lefevre, G, Valtink, M, Engelmann, K and Mascarelli, F (2003). "Activation and role of MAP kinase-dependent pathways in retinal pigment epithelium cells: JNK1, P38 kinase, and cell death." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(3): 1320-9.

- Hedrich, HJ (1990). Genetic monitoring of inbred strains of rats. Stuttgart, New York, Gustav Fisher Verlag.
- Hempel, B, Bednarz, J and Engelmann, K (2001). "Use of a serum-free medium for long-term storage of human corneas. Influence on endothelial cell density and corneal metabolism." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(10): 801-5.
- Heriot, WJ, Henkind, P, Bellhorn, RW and Burns, MS (1984). "Choroidal neovascularization can digest Bruch's membrane. A prior break is not essential." *Ophthalmology* 91(12): 1603-8.
- Herman, KG and Steinberg, RH (1982). "Phagosome movement and the diurnal pattern of phagocytosis in the tapetal retinal pigment epithelium of the opossum." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 23(3): 277-90.
- Herron, WL, Riegel, BW, Myers, OE and Rubin, ML (1969). "Retinal dystrophy in the rat--a pigment epithelial disease." *Invest Ophthalmol* 8(6): 595-604.
- Hescheler, J and Fleischmann, BK (2002). "Regulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in the early developing heart: role of beta1 integrins." *Basic Res Cardiol* 97 Suppl 1: I153-8.
- Hess, HH (1975). "The high calcium content of retinal pigmented epithelium." *Exp Eye Res* 21(5): 471-9.
- Heth, CA and Schmidt, SY (1988). "Protein phosphorylation in cultured rat RPE. Effects of protein kinase C activation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(12): 1794-9.
- Heth, CA and Bernstein, MH (1991a). "Mannose-sensitive HRP endocytosis by the retinal pigment epithelium." *Exp Eye Res* 52(1): 75-82.
- Heth, CA and Schmidt, SY (1991b). "Phagocytic challenge induces changes in phosphorylation of retinal pigment epithelium proteins." *Curr Eye Res* 10(11): 1049-57.
- Heth, CA and Schmidt, SY (1992). "Protein phosphorylation in retinal pigment epithelium of Long-Evans and Royal College of Surgeons rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(10): 2839-47.
- Heth, CA and Marescalchi, PA (1994). "Inositol triphosphate generation in cultured rat retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(2): 409-16.
- Heth, CA, Marescalchi, PA and Ye, L (1995). "IP<sub>3</sub> generation increases rod outer segment phagocytosis by cultured Royal College of Surgeons retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(6): 984-9.
- Higgins, GT, Wang, JH, Dockery, P, Cleary, PE and Redmond, HP (2003). "Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(4): 1775-82.
- Himpens, B, Stalmans, P, Gomez, P, Malfait, M and Vereecke, J (1999). "Intra- and intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling in retinal pigment epithelial cells during mechanical stimulation." *Faseb J* 13 Suppl: S63-8.
- Himpens, B and Vereecke, J (2000). "[Intra- and intercellular Ca(2+)-signal transduction]." *Verh K Acad Geneesk Belg* 62(6): 501-63.
- Hoffmann, S, He, S, Jin, M, Ehren, M, Wiedemann, P, Ryan, SJ and Hinton, DR (2005). "A selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors alphavbeta3 and alphavbeta5 and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion." *BMC Ophthalmol* 5(1): 16.
- Hollyfield, JG and Basinger, SF (1978). "Photoreceptor shedding can be initiated within the eye." *Nature* 274(5673): 794-6.
- Hoppe, G, Marmorstein, AD, Pennock, EA and Hoff, HF (2001). "Oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of processing of photoreceptor outer segments by RPE." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(11): 2714-20.
- Hsu, SM, Raine, L and Fanger, H (1981). "The use of antiavidin antibody and avidin-biotin-peroxidase complex in immunoperoxidase technics." *Am J Clin Pathol* 75(6): 816-21.
- Hu, B, Jennings, JH, Sonstein, J, Floros, J, Todt, JC, Polak, T and Curtis, JL (2004). "Resident murine alveolar and peritoneal macrophages differ in adhesion of apoptotic thymocytes." *Am J Respir Cell Mol Biol* 30(5): 687-93.
- Hu, DN, Ritch, R, McCormick, SA and Pelton-Henrion, K (1992). "Isolation and cultivation of human iris pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(8): 2443-53.
- Hu, DN, McCormick, SA and Ritch, R (1997). "Isolation and culture of iris pigment epithelium from iridectomy specimens of eyes with and without exfoliation syndrome." *Arch Ophthalmol* 115(1): 89-94.
- Hu, J and Bok, D (2001). "A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers." *Mol Vis* 7: 14-9.
- Huang, B and Karwoski, CJ (1992). "Light-evoked expansion of subretinal space volume in the retina of the frog." *J Neurosci* 12(11): 4243-52.
- Ichinose, M, Sawada, M, Sasaki, K and Oomura, Y (1998). "Effect of acidic fibroblast growth factor (aFGF) on phagocytosis in mouse peritoneal macrophages." *Microbiol Immunol* 42(2): 139-42.
- Ikemoto, A, Fukuma, A, Fujii, Y and Okuyama, H (2000). "Lysosomal enzyme activities are decreased in the retina and their circadian rhythms are different from those in the pineal gland of rats fed an alpha-linolenic acid-restricted diet." *J Nutr* 130(12): 3059-62.
- Ishimoto, Y and Nakano, T (2000). "Release of a product of growth arrest-specific gene 6 from rat platelets." *FEBS Lett* 466(1): 197-9.
- Jacob, M, Weech, PK and Salesses, C (1996). "Presence of a light-independent phospholipase A2 in bovine retina but not in rod outer segments." *J Biol Chem* 271(32): 19209-18.
- Jacob, M, Weech, PK and Salesses, C (1997). "Bovine retinal pigment epithelium contains novel types of phospholipase A2." *Biochem J* 327 (Pt 2): 455-60.
- Jaconi, ME, Theler, JM, Schlegel, W and Lew, PD (1993). "Cytosolic free Ca<sup>2+</sup> signals in single adherent human neutrophils: generation and functional role." *Eur J Pediatr* 152 Suppl 1: S26-32.
- Jaffe, GJ, Harrison, CE, Lui, GM, Roberts, WL, Goldsmith, PC, Mesiano, S and Jaffe, RB (1994). "Activin expression by cultured human retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(7): 2924-31.
- Jiang, LQ and Hamasaki, D (1994). "Corneal electroretinographic function rescued by normal retinal pigment epithelial grafts in retinal degenerative Royal College of Surgeons rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(13): 4300-9.
- Job, C and Lagnado, L (1998). "Calcium and protein kinase C regulate the actin cytoskeleton in the synaptic terminal of retinal bipolar cells." *J Cell Biol* 143(6): 1661-72.

- Karl, MO, Engelmann, K and Strauss, O (2002). Involvement of Ca<sup>2+</sup>-Channels and Src Tyrosine Kinases in the Regulation of Photoreceptor Outer Segment (ROS) Phagocytosis By Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells [ARVO Meeting Abstracts]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: E-Abstract 4578.
- Kato, K, Ishiguro, S, Yamamoto, H, Yanai, N, Obinata, M and Tamai, M (1996). "A retinal pigment epithelium-derived cell line from transgenic mouse harboring temperature-sensitive simian virus 40 large T-antigen gene." *Cell Struct Funct* 21(6): 459-68.
- Katz, ML, Eldred, GE and Robison, WG, Jr. (1987). "Lipofuscin autofluorescence: evidence for vitamin A involvement in the retina." *Mech Ageing Dev* 39(1): 81-90.
- Keats, BJ and Corey, DP (1999). "The usher syndromes." *Am J Med Genet* 89(3): 158-66.
- Keller, G and Leuenberger, PM (1977). "Effects of colchicine on phagosome-lysosome interaction in retinal pigment epithelium. II. In vitro observations on histio-organotypical retinal pigment epithelial cells of the pig (a preliminary report)." *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 203(3-4): 253-9.
- Kennedy, CJ, Rakoczy, PE, Robertson, TA, Papadimitriou, JM and Constable, IJ (1994). "Kinetic studies on phagocytosis and lysosomal digestion of rod outer segments by human retinal pigment epithelial cells in vitro." *Exp Cell Res* 210(2): 209-14.
- Kennedy, CJ, Rakoczy, PE and Constable, IJ (1996). "A simple flow cytometric technique to quantify rod outer segment phagocytosis in cultured retinal pigment epithelial cells." *Curr Eye Res* 15(9): 998-1003.
- Kimberling, WJ, Orten, D and Pieke-Dahl, S (2000). "Genetic heterogeneity of Usher syndrome." *Adv Otorhinolaryngol* 56: 11-8.
- Kindzelskii, AL, Elnor, VM, Elnor, SG, Yang, D, Hughes, BA and Petty, HR (2004). "Toll-like receptor 4 (TLR4) of retinal pigment epithelial cells participates in transmembrane signaling in response to photoreceptor outer segments." *J Gen Physiol* 124(2): 139-49.
- Kishi, H, Mishima, HK, Sakamoto, I and Yamashita, U (1996). "Stimulation of retinal pigment epithelial cell growth by neuropeptides in vitro." *Curr Eye Res* 15(7): 708-13.
- Kita, M, Negi, A and Marmor, MF (1992). "Lowering the calcium concentration in the subretinal space in vivo loosens retinal adhesion." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33(1): 23-9.
- Kitaoka, T, Bost, LM, Ishigooka, H, Aotaki-Keen, AE and Hjelmeland, LM (1993). "Increasing cell density down-regulates the expression of acidic FGF by human RPE cells in vitro." *Curr Eye Res* 12(11): 993-9.
- Kjeken, R, Egeberg, M, Habermann, A, Kuehnel, M, Peyron, P, Floetenmeyer, M, Walther, P, Jahraus, A, Defacque, H, Kuznetsov, SA and Griffiths, G (2004). "Fusion between phagosomes, early and late endosomes: a role for actin in fusion between late, but not early endocytic organelles." *Mol Biol Cell* 15(1): 345-58.
- Klein, RJ, Zeiss, C, Chew, EY, Tsai, JY, Sackler, RS, Haynes, C, Henning, AK, SanGiovanni, JP, Mane, SM, Mayne, ST, Bracken, MB, Ferris, FL, Ott, J, Barnstable, C and Hoh, J (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* 308(5720): 385-9.
- Klint, P and Claesson-Welsh, L (1999). "Signal transduction by fibroblast growth factor receptors." *Front Biosci* 4: D165-77.
- Klisovic, DD, O'Dorisio, MS, Katz, SE, Sall, JW, Balster, D, O'Dorisio, TM, Craig, E and Lubow, M (2001). "Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10): 2193-201.
- Kociok, N (2004). "Embryonic stem cells in ophthalmology: the next step to a potential therapy has been taken. "In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells," by Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, Amemiya K, Ooto S, Kitada M, Suemori H, Nakatsuji N, Ide C, Honda Y, Takahashi M. (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(3):1020-1025." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(7): 533-4.
- Koh, SM (2000). "VIP enhances the differentiation of retinal pigment epithelium in culture: from cAMP and pp60(c-src) to melanogenesis and development of fluid transport capacity." *Prog Retin Eye Res* 19(6): 669-88.
- Koh, SW (1992). "The pp60c-src in retinal pigment epithelium and its modulation by vasoactive intestinal peptide." *Cell Biol Int Rep* 16(10): 1003-14.
- Korenbrodt, JI, Brown, DT and Cone, RA (1973). "Membrane characteristics and osmotic behavior of isolated rod outer segments." *J Cell Biol* 56(2): 389-98.
- Krebs, W and Kuhn, H (1977). "Structure of isolated bovine rod outer segment membranes." *Exp Eye Res* 25(5): 511-26.
- Kumar, A (2001). "Retinitis pigmentosa: mutations in a receptor tyrosine kinase gene, MERTK." *J Biosci* 26(1): 3-5.
- Kumar, MV, Nagineni, CN, Chin, MS, Hooks, JJ and Detrick, B (2004). "Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells." *J Neuroimmunol* 153(1-2): 7-15.
- Kuriyama, S, Ohuchi, T, Yoshimura, N and Honda, Y (1991). "Growth factor-induced cytosolic calcium ion transients in cultured human retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32(11): 2882-90.
- Kuriyama, S, Yoshimura, N, Ohuchi, T, Tanihara, H, Ito, S and Honda, Y (1992). "Neuropeptide-induced cytosolic Ca<sup>2+</sup> transients and phosphatidylinositol turnover in cultured human retinal pigment epithelial cells." *Brain Res* 579(2): 227-33.
- Lahiri, D and Bailey, CF (1993). "A comparison of phagocytosis by the retinal pigment epithelium in normal and delayed melanotic chickens." *Exp Eye Res* 56(6): 625-34.
- Laird, DW and Molday, RS (1988). "Evidence against the role of rhodopsin in rod outer segment binding to RPE cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29(3): 419-28.
- Lappas, A, Foerster, AM, Weinberger, AW, Coburger, S, Schrage, NF and Kirchhof, B (2004). "Translocation of iris pigment epithelium in patients with exudative age-related macular degeneration: long-term results." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242(8): 638-47.
- LaVail, MM (1976a). "Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting." *Exp Eye Res* 23(2): 277-80.
- LaVail, MM (1976b). "Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting." *Science* 194(4269): 1071-4.
- LaVail, MM (1980). "Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19(4): 407-11.
- LaVail, MM (1983). "Outer segment disc shedding and phagocytosis in the outer retina." *Trans Ophthalmol Soc U K* 103 (Pt 4): 397-404.
- Lavallee, CR, Chalifoux, JR, Moosally, AJ and Balkema, GW (2003). "Elevated free calcium levels in the subretinal space elevate the absolute dark-adapted threshold in hypopigmented mice." *J Neurophysiol* 90(6): 3654-62.

- Le Blanc, C, Mironneau, C, Barbot, C, Henaff, M, Bondeva, T, Wetzker, R and Macrez, N (2004). "Regulation of vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *Circ Res* 95(3): 300-7.
- Li, JD, Gallemore, RP, Dmitriev, A and Steinberg, RH (1994a). "Light-dependent hydration of the space surrounding photoreceptors in chick retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(6): 2700-11.
- Li, JD, Govardovskii, VI and Steinberg, RH (1994b). "Light-dependent hydration of the space surrounding photoreceptors in the cat retina." *Vis Neurosci* 11(4): 743-52.
- Li, N, Mak, A, Richards, DP, Naber, C, Keller, BO, Li, L and Shaw, AR (2003). "Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation." *Proteomics* 3(4): 536-48.
- Li, ZY, Chang, JH and Milam, AH (1997). "A gradient of basic fibroblast growth factor in rod photoreceptors in the normal human retina." *Vis Neurosci* 14(4): 671-9.
- Lin, H and Clegg, DO (1998). "Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(9): 1703-12.
- Lin, N, Fan, W, Sheedlo, HJ, Aschenbrenner, JE and Turner, JE (1996). "Photoreceptor repair in response to RPE transplants in RCS rats: outer segment regeneration." *Curr Eye Res* 15(10): 1069-77.
- Ling, L and Kung, HJ (1995). "Mitogenic signals and transforming potential of Nyk, a newly identified neural cell adhesion molecule-related receptor tyrosine kinase." *Mol Cell Biol* 15(12): 6582-92.
- Linn, CL and Gafka, AC (1999). "Activation of metabotropic glutamate receptors modulates the voltage-gated sustained calcium current in a teleost horizontal cell." *J Neurophysiol* 81(2): 425-34.
- Lipscombe, D (2002). "L-type calcium channels: highs and new lows." *Circ Res* 90(9): 933-5.
- Lipscombe, D, Helton, TD and Xu, W (2004). "L-type calcium channels: the low down." *J Neurophysiol* 92(5): 2633-41.
- Little, CW, Castillo, B, DiLoreto, DA, Cox, C, Wyatt, J, del Cerro, C and del Cerro, M (1996). "Transplantation of human fetal retinal pigment epithelium rescues photoreceptor cells from degeneration in the Royal College of Surgeons rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(1): 204-11.
- Little, CW, Cox, C, Wyatt, J, del Cerro, C and del Cerro, M (1998). "Correlates of photoreceptor rescue by transplantation of human fetal RPE in the RCS rat." *Exp Neurol* 149(1): 151-60.
- Liu, G, Hilliard, N and Hockerman, GH (2004). "Cav1.3 is preferentially coupled to glucose-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in the pancreatic beta cell line INS-1." *Mol Pharmacol* 65(5): 1269-77.
- Livsey, CT, Huang, B, Xu, J and Karwoski, CJ (1990). "Light-evoked changes in extracellular calcium concentration in frog retina." *Vision Res* 30(6): 853-61.
- Lolley, RN and Farber, DB (1976). "A proposed link between debris accumulation, guanosine 3', 5' cyclic monophosphate changes and photoreceptor cell degeneration in retina of RCS rats." *Exp Eye Res* 22(5): 477-86.
- Lopez-Colome, AM, Salceda, R and Fragoso, G (1993). "Specific interaction of glutamate with membranes from cultured retinal pigment epithelium." *J Neurosci Res* 34(4): 454-61.
- Lopez-Colome, AM, Fragoso, G, Wright, CE and Sturman, JA (1994). "Excitatory amino acid receptors in membranes from cultured human retinal pigment epithelium." *Curr Eye Res* 13(8): 553-60.
- Lu, Q and Lemke, G (2001). "Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family." *Science* 293(5528): 306-11.
- Lund, RD, Adamson, P, Sauve, Y, Keegan, DJ, Girman, SV, Wang, S, Winton, H, Kanuga, N, Kwan, AS, Beauchene, L, Zerbib, A, Hetherington, L, Couraud, PO, Coffey, P and Greenwood, J (2001a). "Subretinal transplantation of genetically modified human cell lines attenuates loss of visual function in dystrophic rats." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9942-7.
- Lund, RD, Kwan, AS, Keegan, DJ, Sauve, Y, Coffey, PJ and Lawrence, JM (2001b). "Cell transplantation as a treatment for retinal disease." *Prog Retin Eye Res* 20(4): 415-49.
- Lutz, DA, Guo, Y and McLaughlin, BJ (1995). "Natural, high-mannose glycoproteins inhibit ROS binding and ingestion by RPE cell cultures." *Exp Eye Res* 61(4): 487-93.
- Macrez, N, Mironneau, C, Carricaburu, V, Quignard, JF, Babich, A, Czupalla, C, Nurnberg, B and Mironneau, J (2001). "Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca<sup>2+</sup> channels." *Circ Res* 89(8): 692-9.
- Malecaze, F, Mascarelli, F, Bugra, K, Fuhrmann, G, Courtois, Y and Hicks, D (1993). "Fibroblast growth factor receptor deficiency in dystrophic retinal pigmented epithelium." *J Cell Physiol* 154(3): 631-42.
- Malecot, CO, Bito, V and Argibay, JA (1998). "Ruthenium red as an effective blocker of calcium and sodium currents in guinea-pig isolated ventricular heart cells." *Br J Pharmacol* 124(3): 465-72.
- Malfait, M, Gomez, P, van Veen, TA, Parys, JB, De Smedt, H, Vereecke, J and Himpens, B (2001). "Effects of hyperglycemia and protein kinase C on connexin43 expression in cultured rat retinal pigment epithelial cells." *J Membr Biol* 181(1): 31-40.
- Manfioletti, G, Brancolini, C, Avanzi, G and Schneider, C (1993). "The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade." *Mol Cell Biol* 13(8): 4976-85.
- Mannerstrom, M, Maenpaa, H, Toimela, T, Salminen, L and Tahti, H (2001). "The phagocytosis of rod outer segments is inhibited by selected drugs in retinal pigment epithelial cell cultures." *Pharmacol Toxicol* 88(1): 27-33.
- Marmor, MF and Maack, T (1982). "Local environmental factors and retinal adhesion in the rabbit." *Exp Eye Res* 34(5): 727-33.
- Marmor, MF and Wolfensberger, TJ (1998). *The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease*. Oxford University Press.
- Mascarelli, F, Raulais, D and Courtois, Y (1989). "Fibroblast growth factor phosphorylation and receptors in rod outer segments." *Embo J* 8(8): 2265-73.
- Mascarelli, F, Torriglia, A, Soubrane, G, Hicks, D, Malecaze, F and Courtois, Y (1991). "[FGF and physiopathological implications]." *Ann Endocrinol (Paris)* 52(6): 441-6.
- Mascarelli, F, Hecquet, C, Guillonneau, X and Courtois, Y (2001). "[Control of the intracellular signaling induced by fibroblast growth factors (FGF) over the proliferation and survival of retinal pigment epithelium cells: example of the signaling regulation of growth factors endogenous to the retina]." *J Soc Biol* 195(2): 101-6.

- Mather, JP (1998). "Making informed choices: medium, serum, and serum-free medium. How to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create." *Methods Cell Biol* 57: 19-30.
- Matsumoto, B, Defoe, DM and Besharse, JC (1987). "Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 230(1260): 339-54.
- Mayerson, PL and Hall, MO (1986). "Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro." *J Cell Biol* 103(1): 299-308.
- McConnell, DG (1965). "The isolation of retinal outer segment fragments." *J Cell Biol* 27(3): 459-73.
- McHenry, CL, Liu, Y, Feng, W, Nair, AR, Feathers, KL, Ding, X, Gal, A, Vollrath, D, Sieving, PA and Thompson, DA (2004). "MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(5): 1456-63.
- McKay, BS and Burke, JM (1994). "Separation of phenotypically distinct subpopulations of cultured human retinal pigment epithelial cells." *Exp Cell Res* 213(1): 85-92.
- McLaren, MJ, Inana, G and Li, CY (1993). "Double fluorescent vital assay of phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(2): 317-26.
- McLaren, MJ (1996). "Kinetics of rod outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. Relationship to cell morphology." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37(7): 1213-24.
- McLaren, MJ, An, W, Brown, ME and Inana, G (1996). "Analysis of basic fibroblast growth factor in rats with inherited retinal degeneration." *FEBS Lett* 387(1): 63-70.
- McLaren, MJ and Inana, G (1997). "Inherited retinal degeneration: basic FGF induces phagocytic competence in cultured RPE cells from RCS rats." *FEBS Lett* 412(1): 21-9.
- McLaughlin, BJ, Cooper, NG and Shepherd, V (1994). How Good is the Evidence to Suggest that Phagocytosis of ROS by RPE is Receptor Mediated? Progress in retinal and eye research. Oxford. 1: 147-164.
- Mergler, S, Steinhausen, K, Wiederholt, M and Strauss, O (1998). "Altered regulation of L-type channels by protein kinase C and protein tyrosine kinases as a pathophysiologic effect in retinal degeneration." *Faseb J* 12(12): 1125-34.
- Mergler, S and Strauss, O (2002). "Stimulation of L-type Ca(2+) channels by increase of intracellular InsP3 in rat retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 74(1): 29-40.
- Miceli, MV and Newsome, DA (1994). "Insulin stimulation of retinal outer segment uptake by cultured human retinal pigment epithelial cells determined by a flow cytometric method." *Exp Eye Res* 59(3): 271-80.
- Miceli, MV and Newsome, DA (1996). "Effects of extracellular matrix and Bruch's membrane on retinal outer segment phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium." *Curr Eye Res* 15(1): 17-26.
- Miceli, MV, Newsome, D and Tate, D (1997a). "Phagocytosis of ROS by RPE Cells is Coupled to Diverse Transmembrane Signaling Pathways." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38(4): S329.
- Miceli, MV, Newsome, DA and Tate, DJ, Jr. (1997b). "Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(8): 1588-97.
- Milner, R, Huang, X, Wu, J, Nishimura, S, Pytela, R, Sheppard, D and French-Constant, C (1999). "Distinct roles for astrocyte  $\alpha$ 5 and  $\alpha$ 8 integrins in adhesion and migration." *J Cell Sci* 112 (Pt 23): 4271-9.
- Mitchell, CH (2001). "Release of ATP by a human retinal pigment epithelial cell line: potential for autocrine stimulation through subretinal space." *J Physiol* 534(Pt 1): 193-202.
- Mitsuhiro, MR, Eguchi, S and Yamashita, H (2003). "Regulation mechanisms of retinal pigment epithelial cell migration by the TGF-beta superfamily." *Acta Ophthalmol Scand* 81(6): 630-8.
- Molday, LL and Molday, RS (1987). "Glycoproteins specific for the retinal rod outer segment plasma membrane." *Biochim Biophys Acta* 897(2): 335-40.
- Moller-Pedersen, T, Hartmann, U, Ehlers, N and Engelmann, K (2001). "Evaluation of potential organ culture media for eye banking using a human corneal endothelial cell growth assay." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239(10): 778-82.
- Moriarty, P, Dickson, AJ, Erichsen, JT and Boulton, M (2000). "Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells." *Ophthalmic Res* 32(2-3): 57-60.
- Morimoto, A, Matsuda, S, Uryu, K, Fujita, H, Okumura, N and Sakanaka, M (1993). "Light- and electron-microscopic localization of basic fibroblast growth factor in adult rat retina." *Okajimas Folia Anat Jpn* 70(1): 7-12.
- Mousa, SA, Lorelli, W and Campochiaro, PA (1999). "Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells." *J Cell Biochem* 74(1): 135-43.
- Murakami, Y, Mizuno, S, Hori, M and Uehara, Y (1988). "Reversal of transformed phenotypes by herbimycin A in src oncogene expressed rat fibroblasts." *Cancer Res* 48(6): 1587-90.
- Nabi, IR, Mathews, AP, Cohen-Gould, L, Gundersen, D and Rodriguez-Boulan, E (1993). "Immortalization of polarized rat retinal pigment epithelium." *J Cell Sci* 104 (Pt 1): 37-49.
- Nakanishi, S, Fujii, A, Nakade, S and Mikoshiba, K (1996). "Immunohistochemical localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in non-neural tissues, with special reference to epithelia, the reproductive system, and muscular tissues." *Cell Tissue Res* 285(2): 235-51.
- Nandrot, E, Dufour, EM, Provost, AC, Pequignot, MO, Bonnel, S, Gogat, K, Marchant, D, Rouillac, C, Sepulchre de Conde, B, Bihoreau, MT, Shaver, C, Dufier, JL, Marsac, C, Lathrop, M, Menasche, M and Abitbol, MM (2000). "Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis." *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B): 586-99.
- Nandrot, EF and Finnemann, SC (2003). "Rac1 Activation by  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>5</sub> Integrin Receptor Signaling Is Required for OS Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(5): 942-.
- Nandrot, EF and Finnemann, SC (2004a). "Expression and phagocytic function of  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>5</sub>-GFP integrin in RPE cells." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(5): 3675-.
- Nandrot, EF, Kim, Y, Brodie, SE, Huang, X, Sheppard, D and Finnemann, SC (2004b). "Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking  $\alpha$ <sub>v</sub> $\beta$ <sub>5</sub> integrin." *J Exp Med* 200(12): 1539-45.

- Nandrot, EF, Sircar, M, Anand, M and Finnemann, SC (2005). "Reduced Retinal Adhesion in Mice Lacking AVB5 Integrin." *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46(5): 5586-.
- Nash, MS and Osborne, NN (1995). "Agonist-induced effects on cyclic AMP metabolism are affected in pigment epithelial cells of the Royal College of Surgeons rat." *Neurochem Int* 27(3): 253-62.
- Navedo, MF, Amberg, GC, Votaw, VS and Santana, LF (2005). "Constitutively active L-type Ca<sup>2+</sup> channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): 11112-7.
- Neher, E (1998). "Vesicle pools and Ca<sup>2+</sup> microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release." *Neuron* 20(3): 389-99.
- Nesti, LJ, Caterson, EJ, Wang, M, Chang, R, Chapovsky, F, Hoek, JB and Tuan, RS (2002a). "TGF-beta1 calcium signaling increases alpha5 integrin expression in osteoblasts." *J Orthop Res* 20(5): 1042-9.
- Nesti, LJ, Caterson, EJ, Wang, M, Chang, R, Chapovsky, F, Hoek, JB and Tuan, RS (2002b). "TGF-beta1-stimulated osteoblasts require intracellular calcium signaling for enhanced alpha5 integrin expression." *Ann N Y Acad Sci* 961: 178-82.
- Neuner-Jehle, M, Berghe, LV, Bonnel, S, Uteza, Y, Benmeziane, F, Rouillot, JS, Marchant, D, Kobetz, A, Dufier, JL, Menasche, M and Abitbol, M (2000). "Ocular cell transfection with the human basic fibroblast growth factor gene delays photoreceptor cell degeneration in RCS rats." *Hum Gene Ther* 11(13): 1875-90.
- Nguyen-Legros, J and Hicks, D (2000). "Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium." *Int Rev Cytol* 196: 245-313.
- Nilsson, SE, Sundelin, SP, Wihlmark, U and Brunk, UT (2003). "Aging of cultured retinal pigment epithelial cells: oxidative reactions, lipofuscin formation and blue light damage." *Doc Ophthalmol* 106(1): 13-6.
- Obata, H, Kaji, Y, Yamada, H, Kato, M, Tsuru, T and Yamashita, H (1999). "Expression of transforming growth factor-beta superfamily receptors in rat eyes." *Acta Ophthalmol Scand* 77(2): 151-6.
- Ogata, N, Nishizawa, M, Ando, A and Uyama, M (1999). "Transfection of basic fibroblast growth factor (bFGF) gene or bFGF antisense fene into human retinal pigment epithelial cells." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(8): 678-84.
- Oka, MS, Landers, RA and Bridges, CD (1984). "A serum-free defined medium for retinal pigment epithelial cells." *Exp Cell Res* 154(2): 537-47.
- Palfrey, HC and Artalejo, CR (2003). "Secretion: kiss and run caught on film." *Curr Biol* 13(10): R397-9.
- Panessa, BJ and Zadunaisky, JA (1981). "Pigment granules: a calcium reservoir in the vertebrate eye." *Exp Eye Res* 32(5): 593-604.
- Papermaster, DS (1982). "Preparation of retinal rod outer segments." *Methods Enzymol* 81: 48-52.
- Peng, S, Rahner, C and Rizzolo, LJ (2003). "Apical and basal regulation of the permeability of the retinal pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2): 808-17.
- Peters, S, Kayatz, P, Heimann, K and Schraermeyer, U (2000). "Subretinal injection of rod outer segments leads to an increase in the number of early-stage melanosomes in retinal pigment epithelial cells." *Ophthalmic Res* 32(2-3): 52-6.
- Peters, S and Schraermeyer, U (2001). "[Characteristics and functions of melanin in retinal pigment epithelium]." *Ophthalmologie* 98(12): 1181-5.
- Peterson, WM, Meggyesy, C, Yu, K and Miller, SS (1997). "Extracellular ATP activates calcium signaling, ion, and fluid transport in retinal pigment epithelium." *J Neurosci* 17(7): 2324-37.
- Petit, C (2001). "Usher syndrome: from genetics to pathogenesis." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2: 271-97.
- Pfeffer, BA (1990). Improved methodology for cell culture of human and monkey retinal pigment epithelium. In: *Progression in Retinal Research*. Pergamon Press. 7: 251-291.
- Philp, NJ, Nachmias, VT, Lee, D, Stramm, L and Buzdygon, B (1988). "Is rhodopsin the ligand for receptor-mediated phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium?" *Exp Eye Res* 46(1): 21-8.
- Poulaki, V, Mitsiades, N, Kruse, FE, Radetzky, S, Iliaki, E, Kirchhof, B and Joussen, AM (2004). "Activin a in the regulation of corneal neovascularization and vascular endothelial growth factor expression." *Am J Pathol* 164(4): 1293-302.
- Puck, TT (1958). "Growth and genetics in somatic mammalian cells in vitro." *J Cell Physiol* 52(Supp 1): 287-302; discussion 302-11.
- Puck, TT, Ciciura, SJ and Robinson, A (1958). "Genetics of somatic mammalian cells. Long-term cultivation of enploid cells from human and animal subjects." *J. Exp. Med.* (108): 945-956.
- Quignard, JF, Mironneau, J, Carricaburu, V, Fournier, B, Babich, A, Nurnberg, B, Mironneau, C and Macrez, N (2001). "Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes." *J Biol Chem* 276(35): 32545-51.
- Radtke, ND, Seiler, MJ, Aramant, RB, Petry, HM and Pidwell, DJ (2002). "Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients." *Am J Ophthalmol* 133(4): 544-50.
- Rahi, AH, Grierson, I and Ashton, N (1980). "Contractile proteins in ocular tissues. Their role in health and disease." *Trans Ophthalmol Soc U K* 100(Pt 1): 155-61.
- Rakoczy, PE, Humphrey, MF, Cavaney, DM, Chu, Y and Constable, IJ (1993). "Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor in the retina of Royal College of Surgeons rats. A comparative study." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(5): 1845-52.
- Rakoczy, PE, Zhang, D, Robertson, T, Barnett, NL, Papadimitriou, J, Constable, IJ and Lai, CM (2002). "Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model." *Am J Pathol* 161(4): 1515-24.
- Ramakers, GJ, Avci, B, van Hulten, P, van Ooyen, A, van Pelt, J, Pool, CW and Lequin, MB (2001). "The role of calcium signaling in early axonal and dendritic morphogenesis of rat cerebral cortex neurons under non-stimulated growth conditions." *Brain Res Dev Brain Res* 126(2): 163-72.
- Rehder, V and Cheng, S (1998). "Autonomous regulation of growth cone filopodia." *J Neurobiol* 34(2): 179-92.
- Reich-d'Almeida, FB and Hockley, DJ (1975a). "In situ reactivity of the retinal pigment epithelium. II. Phagocytosis in the dystrophic rat." *Exp Eye Res* 21(4): 347-357.

- Reich-d'Almeida, FB and Hockley, DJ (1975b). "In situ reactivity of the retinal pigment epithelium. I. Phagocytosis in the normal rat." *Exp Eye Res* 21(4): 333-345.
- Reid, DM, Laird, DW and Molday, RS (1992). "Characterization and application of an in vitro detection system for studying the binding and phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 54(5): 775-83.
- Reigada, D and Mitchell, CH (2005). "Release of ATP from retinal pigment epithelial cells involves both CFTR and vesicular transport." *Am J Physiol Cell Physiol* 288(1): C132-40.
- Reuss, B and von Bohlen und Halbach, O (2003). "Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system." *Cell Tissue Res* 313(2): 139-57.
- Rezai, KA, Lai, WW, Farrokh-Siar, L, Pearlman, J, Shu, J, Patel, SC and Ernest, JT (1997a). "A new method of culturing and transferring iris pigment epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(11): 2255-60.
- Rezai, KA, Lappas, A, Farrokh-siar, L, Kohlen, L, Wiedemann, P and Heimann, K (1997b). "Iris pigment epithelial cells of long evans rats demonstrate phagocytic activity." *Exp Eye Res* 65(1): 23-9.
- Rezai, KA, Lappas, A, Kohlen, L, Wiedemann, P and Heimann, K (1997c). "Comparison of tight junction permeability for albumin in iris pigment epithelium and retinal pigment epithelium in vitro." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235(1): 48-55.
- Roberts, RL, Mounessa, NL and Gallin, JI (1984). "Increasing extracellular potassium causes calcium-dependent shape change and facilitates concanavalin A capping in human neutrophils." *J Immunol* 132(4): 2000-6.
- Roberts, WM (1994). "Localization of calcium signals by a mobile calcium buffer in frog saccular hair cells." *J Neurosci* 14(5 Pt 2): 3246-62.
- Robles, E, Huttenlocher, A and Gomez, TM (2003). "Filopodial calcium transients regulate growth cone motility and guidance through local activation of calpain." *Neuron* 38(4): 597-609.
- Rodriguez de Turco, EB, Gordon, WC and Bazan, NG (1992). "Light stimulates in vivo inositol lipid turnover in frog retinal pigment epithelial cells at the onset of shedding and phagocytosis of photoreceptor membranes." *Exp Eye Res* 55(5): 719-25.
- Rosen, A and Casciola-Rosen, L (2001). "Clearing the way to mechanisms of autoimmunity." *Nat Med* 7(6): 664-5.
- Rosenthal, R, Thieme, H and Strauss, O (2001). "Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in brain neurons and retinal pigment epithelial cells act via stimulation of neuroendocrine L-type channels (Ca(v)1.3)." *Faseb J* 15(6): 970-7.
- Rosenthal, R and Strauss, O (2002). "Ca<sup>2+</sup>-channels in the RPE." *Adv Exp Med Biol* 514: 225-35.
- Ryeom, SW, Silverstein, RL, Scotto, A and Sparrow, JR (1996a). "Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36." *J Biol Chem* 271(34): 20536-9.
- Ryeom, SW, Sparrow, JR and Silverstein, RL (1996b). "CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium." *J Cell Sci* 109 (Pt 2): 387-95.
- Sakai, H and Saito, T (1997). "Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> channel expression in cultured newt retinal pigment epithelial cells: comparison with neuronal types of ion channels." *J Neurobiol* 32(4): 377-90.
- Salceda, R (1989). "45Ca uptake by retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 30(10): 2114-7.
- Salceda, R (1992). "Zymosan induced 45Ca uptake by retinal pigment epithelial cells." *Curr Eye Res* 11(3): 195-201.
- Salceda, R and Sanchez-Chavez, G (2000). "Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium." *Cell Calcium* 27(4): 223-9.
- Sall, JW, Klisovic, DD, O'Dorisio, MS and Katz, SE (2004). "Somatostatin inhibits IGF-1 mediated induction of VEGF in human retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 79(4): 465-76.
- Sarangarajan, R and Apte, SP (2005). "Melanization and phagocytosis: implications for age related macular degeneration." *Mol Vis* 11: 482-90.
- Schellhorn, M, Bednarz, J, Valtink, M, Engelmann, K and Richard, G (1999). "Proliferation of human Retinal Pigment Epithelium in-vitro and the influence of transfection with SV40 large and small t-antigen [ARVO Abstract]." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(4): S219. Abstract nr 1157.
- Schindelholz, B and Reber, BF (2000). "L-type Ca<sup>2+</sup> channels and purinergic P2X2 cation channels participate in calcium-tyrosine kinase-mediated PC12 growth cone arrest." *Eur J Neurosci* 12(1): 194-204.
- Schlichtenbrede, FC, Sarra, GM, Ali, RR, Wiedemann, P and Reichel, MB (2002). "[Progress in somatic gene therapy of retinal degeneration in the animal model]." *Ophthalmologe* 99(4): 259-65.
- Schmitz, G and Rothe, G (1994). *Durchflusszytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart, New York, Schattauer Verlag.
- Schmitz, Y and Witkovsky, P (1996). "Glutamate release by the intact light-responsive photoreceptor layer of the *Xenopus* retina." *J Neurosci Methods* 68(1): 55-60.
- Schmitz, Y and Witkovsky, P (1997). "Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel." *Neuroscience* 78(4): 1209-16.
- Schraermeyer, U, Enzmann, V, Kohlen, L, Addicks, K, Wiedemann, P and Heimann, K (1997). "Porcine iris pigment epithelial cells can take up retinal outer segments." *Exp Eye Res* 65(2): 277-87.
- Schraermeyer, U and Heimann, K (1999a). "Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation." *Pigment Cell Res* 12(4): 219-36.
- Schraermeyer, U, Kociok, N and Heimann, K (1999b). "Rescue effects of IPE transplants in RCS rats: short-term results." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(7): 1545-56.
- Schraermeyer, U, Peters, S, Thumann, G, Kociok, N and Heimann, K (1999c). "Melanin granules of retinal pigment epithelium are connected with the lysosomal degradation pathway." *Exp Eye Res* 68(2): 237-45.
- Schraermeyer, U, Kayatz, P, Thumann, G, Luther, TT, Szurman, P, Kociok, N and Bartz-Schmidt, KU (2000). "Transplantation of iris pigment epithelium into the choroid slows down the degeneration of photoreceptors in the RCS rat." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238(12): 979-84.
- Schutt, F, Bergmann, M, Kopitz, J and Holz, FG (2001). "[Mechanism of the inhibition of lysosomal functions in the retinal pigment epithelium by lipofuscin retinoid component A2-E]." *Ophthalmologe* 98(8): 721-4.
- Seiler, MJ and Aramant, RB (2005). "Transplantation of neuroblastic progenitor cells as a sheet preserves and restores retinal function." *Semin Ophthalmol* 20(1): 31-42.

- Senda, N and Ueda, Y (1967). "[Phagocytic activity test]." *Rinsho Byori* 15(13): Suppl 13:88-93.
- Shacter, E, Williams, JA, Hinson, RM, Senturker, S and Lee, YJ (2000). "Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis." *Blood* 96(1): 307-13.
- Sheedlo, HJ, Li, L and Turner, JE (1989). "Photoreceptor cell rescue in the RCS rat by RPE transplantation: a therapeutic approach in a model of inherited retinal dystrophy." *Prog Clin Biol Res* 314: 645-58.
- Sheedlo, HJ, Li, L and Turner, JE (1991). "Photoreceptor cell rescue at early and late RPE-cell transplantation periods during retinal disease in RCS dystrophic rats." *J Neural Transplant Plast* 2(1): 55-63.
- Sheedlo, HJ, Srinivasan, B, Brun-Zinkernagel, AM, Roque, CH, Lambert, W, Wordinger, RJ and Roque, RS (2002). "Expression of p75(NTR) in photoreceptor cells of dystrophic rat retinas." *Brain Res Mol Brain Res* 103(1-2): 71-9.
- Sheu, SJ, Sakamoto, T, Osusky, R, Wang, HM, Ogden, TE, Ryan, SJ, Hinton, DR and Gopalakrishna, R (1994). "Transforming growth factor-beta regulates human retinal pigment epithelial cell phagocytosis by influencing a protein kinase C-dependent pathway." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 232(11): 695-701.
- Shih, CC, Mamelak, A, LeBon, T and Forman, SJ (2002). "Hematopoietic potential of neural stem cells." *Nat Med* 8(6): 535-6; author reply 536-7.
- Shiratsuchi, A, Watanabe, I, Takeuchi, O, Akira, S and Nakanishi, Y (2004). "Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages." *J Immunol* 172(4): 2039-47.
- Simpson, PB and Armstrong, RC (1999). "Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration." *Glia* 26(1): 22-35.
- Sippy, BD, Hofman, FM, He, S, Osusky, R, Sheu, SJ, Walker, SM, Ryan, SJ and Hinton, DR (1995). "SV40-immortalized and primary cultured human retinal pigment epithelial cells share similar patterns of cytokine-receptor expression and cytokine responsiveness." *Curr Eye Res* 14(6): 495-503.
- Smith-Thomas, LC, Richardson, PS, Rennie, IG, Palmer, I, Boulton, M, Sheridan, C and MacNeil, S (2000). "Influence of pigment content, intracellular calcium and cyclic AMP on the ability of human retinal pigment epithelial cells to contract collagen gels." *Curr Eye Res* 21(1): 518-29.
- Sobottka Ventura, AC, Bohnke, M, Loliger, C, Kuhn, P, Winter, R and Engelmann, K (1996). "[HLA typing of donor corneas with extended post mortem time]." *Ophthalmologie* 93(3): 262-7.
- Song, MK and Lui, GM (1990). "Propagation of fetal human RPE cells: preservation of original culture morphology after serial passage." *J Cell Physiol* 143(1): 196-203.
- Sparrow, JR, Ryeom, SW, Abumrad, NA, Ibrahim, A and Silverstein, RL (1997). "CD36 expression is altered in retinal pigment epithelial cells of the RCS rat." *Exp Eye Res* 64(1): 45-56.
- Spraul, CW, Kaven, C, Lang, GK and Lang, GE (2004). "Effect of growth factors on bovine retinal pigment epithelial cell migration and proliferation." *Ophthalmic Res* 36(3): 166-71.
- Stalmans, P and Himpens, B (1997). "Confocal imaging of Ca<sup>2+</sup> signaling in cultured rat retinal pigment epithelial cells during mechanical and pharmacologic stimulation." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38(1): 176-87.
- Stalmans, P and Himpens, B (1998). "A decreased Ca<sup>2+</sup>-wave propagation is found among cultured RPE cells from dystrophic RCS rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(8): 1493-502.
- Stalmans, P and Himpens, B (1999). "Properties of intra- and intercellular Ca(2+)-wave propagation elicited by mechanical stimulation in cultured RPE cells." *Cell Calcium* 25(6): 391-9.
- Steinberg, RH, Linsenmeier, RA and Griff, ER (1983). "Three light-evoked responses of the retinal pigment epithelium." *Vision Res* 23(11): 1315-23.
- Steinberg, RH (1985). "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina." *Doc Ophthalmol* 60(4): 327-46.
- Strauss, O and Wienrich, M (1993). "Cultured retinal pigment epithelial cells from RCS rats express an increased calcium conductance compared with cells from non-dystrophic rats." *Pflugers Arch* 425(1-2): 68-76.
- Strauss, O and Wienrich, M (1994a). "Extracellular matrix proteins as substrate modulate the pattern of calcium channel expression in cultured rat retinal pigment epithelial cells." *Pflugers Arch* 429(1): 137-9.
- Strauss, O and Wienrich, M (1994b). "Ca(2+)-conductances in cultured rat retinal pigment epithelial cells." *J Cell Physiol* 160(1): 89-96.
- Strauss, O, Wiederholt, M and Wienrich, M (1996). "Activation of Cl<sup>-</sup> currents in cultured rat retinal pigment epithelial cells by intracellular applications of inositol-1,4,5-triphosphate: differences between rats with retinal dystrophy (RCS) and normal rats." *J Membr Biol* 151(2): 189-200.
- Strauss, O, Mergler, S and Wiederholt, M (1997). "Regulation of L-type calcium channels by protein tyrosine kinase and protein kinase C in cultured rat and human retinal pigment epithelial cells." *Faseb J* 11(11): 859-67.
- Strauss, O, Steinhausen, K, Wienrich, M and Wiederholt, M (1998a). "Activation of a Cl<sup>-</sup>-conductance by protein kinase-dependent phosphorylation in cultured rat retinal pigment epithelial cells." *Exp Eye Res* 66(1): 35-42.
- Strauss, O, Stumpff, F, Mergler, S, Wienrich, M and Wiederholt, M (1998b). "The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect." *Acta Anat (Basel)* 162(2-3): 101-11.
- Strauss, O, Steinhausen, K, Mergler, S, Stumpff, F and Wiederholt, M (1999). "Involvement of protein tyrosine kinase in the InsP<sub>3</sub>-induced activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent Cl<sup>-</sup> currents in cultured cells of the rat retinal pigment epithelium." *J Membr Biol* 169(3): 141-53.
- Strauss, O, Buss, F, Rosenthal, R, Fischer, D, Mergler, S, Stumpff, F and Thieme, H (2000). "Activation of neuroendocrine L-type channels (alpha1D subunits) in retinal pigment epithelial cells and brain neurons by pp60(c-src)." *Biochem Biophys Res Commun* 270(3): 806-10.
- Strauss, O (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." *Physiol Rev* 85(3): 845-81.
- Sullivan, DM, Erb, L, Anglade, E, Weisman, GA, Turner, JT and Csaky, KG (1997). "Identification and characterization of P2Y<sub>2</sub> nucleotide receptors in human retinal pigment epithelial cells." *J Neurosci Res* 49(1): 43-52.
- Sun, DS, Lo, SJ, Lin, CH, Yu, MS, Huang, CY, Chen, YF and Chang, HH (2005). "Calcium oscillation and phosphatidylinositol 3-kinase positively regulate integrin alpha5beta3-mediated outside-in signaling." *J Biomed Sci* 12(2): 321-33.

- Sun, H and Nathans, J (2001). "The challenge of macular degeneration." *Sci Am* 285(4): 68-75.
- Takeuchi, O and Akira, S (2001). "Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system." *Int Immunopharmacol* 1(4): 625-35.
- Tamai, M and O'Brien, PJ (1979). "Retinal dystrophy in the RCS rat: in vivo and in vitro studies of phagocytic action of the pigment epithelium on the shed rod outer segments." *Exp Eye Res* 28(4): 399-411.
- Tamai, M, Mizuno, K and Chader, GJ (1982). "In vitro studies on shedding and phagocytosis of rod outer segments in the rat retina: effect of oxygen concentration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 22(4): 439-48.
- Tamai, M (1996). "[Retinal pigment epithelial cell transplantation: perspective]." *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 100(12): 982-1006.
- Tapper, H, Furuya, W and Grinstein, S (2002). "Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca<sup>2+</sup>-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules." *J Immunol* 168(10): 5287-96.
- Tejle, K, Magnusson, KE and Rasmusson, B (2002). "Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by calcium in J774 macrophages interacting with unopsonized prey." *Biosci Rep* 22(5-6): 529-40.
- Tezel, TH and Del Priore, LV (1998). "Serum-free media for culturing and serial-passaging of adult human retinal pigment epithelium." *Exp Eye Res* 66(6): 807-15.
- Thompson, DA, McHenry, CL, Li, Y, Richards, JE, Othman, MI, Schwinger, E, Vollrath, D, Jacobson, SG and Gal, A (2002). "Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in RPE65 or MERTK, respectively." *Am J Hum Genet* 70(1): 224-9.
- Thumann, G, Bartz-Schmidt, KU, Heimann, K and Schraermeyer, U (1998). "Phagocytosis of rod outer segments by human iris pigment epithelial cells in vitro." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 236(10): 753-7.
- Thumann, G and Kirchhof, B (2004). "[Transplantation of iris pigment epithelium]." *Ophthalmologie* 101(9): 882-5.
- Tian, J, Ishibashi, K and Handa, JT (2004). "The expression of native and cultured RPE grown on different matrices." *Physiol Genomics* 17(2): 170-82.
- Todt, JC, Hu, B and Curtis, JL (2004). "The receptor tyrosine kinase MerTK activates phospholipase C gamma2 during recognition of apoptotic thymocytes by murine macrophages." *J Leukoc Biol* 75(4): 705-13.
- Toker, A (1998). "Signaling through protein kinase C." *Front Biosci* 3: D1134-47.
- Tschernutter, M, Schlichtenbrede, FC, Howe, S, Balaggan, KS, Munro, PM, Bainbridge, JW, Thrasher, AJ, Smith, AJ and Ali, RR (2005). "Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy." *Gene Ther* 12(8): 694-701.
- Tso, MO, Zhang, C, Abler, AS, Chang, CJ, Wong, F, Chang, GQ and Lam, TT (1994). "Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35(6): 2693-9.
- Ueda, Y and Steinberg, RH (1993). "Voltage-operated calcium channels in fresh and cultured rat retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34(12): 3408-18.
- Ueda, Y and Steinberg, RH (1995). "Dihydropyridine-sensitive calcium currents in freshly isolated human and monkey retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36(2): 373-80.
- Uehara, Y and Fukazawa, H (1991). "Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein-tyrosine kinases." *Methods Enzymol* 201: 370-9.
- Uetama, T, Ohno-Matsui, K, Nakahama, K, Morita, I and Mochizuki, M (2003). "Phenotypic change regulates monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) gene expression in human retinal pigment epithelial cells." *J Cell Physiol* 197(1): 77-85.
- Valentin, F, Bueb, J, Capdeville-Atkinson, C and Tschirhart, E (2001). "Rac-1-mediated O<sub>2</sub>- secretion requires Ca<sup>2+</sup> influx in neutrophil-like HL-60 cells." *Cell Calcium* 29(6): 409-15.
- Valter, K, van Driel, D, Bisti, S and Stone, J (2002). "FGFR1 expression and FGFR1-FGF-2 colocalisation in rat retina: sites of FGF-2 action on rat photoreceptors." *Growth Factors* 20(4): 177-88.
- Valtink, M, Engelmann, K, Kruger, R, Schellhorn, ML, Loliger, C, Puschel, K and Richard, G (1999a). "[Structure of a cell bank for transplantation of HLA-typed, cryopreserved human adult retinal pigment epithelial cells]." *Ophthalmologie* 96(10): 648-52.
- Valtink, M, Engelmann, K, Strauss, O, Kruger, R, Loliger, C, Ventura, AS and Richard, G (1999b). "Physiological features of primary cultures and subcultures of human retinal pigment epithelial cells before and after cryopreservation for cell transplantation." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 237(12): 1001-6.
- Valtink, M, Karl, MO, Bednarz, J and Engelmann, K (2002). "Short-Term Influence of Culture Media and Supplements on Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments by Cultured Human Retinal Pigment Epithelium." *ARVO Meeting Abstracts* 43(12): 716-.
- Van Den Berghe, L, Sinton, K, Gogat, K, Marchant, D, Dufour, E, Bonnel, S, Gadin, S, Menasche, M and Abitbol, M (2004). "Prosaposin gene expression in normal and dystrophic RCS rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(5): 1297-305.
- van der Schaft, TL, Mooy, CM, de Bruijn, WC and de Jong, PT (1993). "Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study." *Br J Ophthalmol* 77(10): 657-61.
- van Kooyk, Y and Figdor, CG (2000). "Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion." *Curr Opin Cell Biol* 12(5): 542-7.
- Vasilaki, A, Papadaki, T, Notas, G, Kolios, G, Mastrodimitou, N, Hoyer, D, Tsilimbaris, M, Kouroumalis, E, Pallikaris, I and Themos, K (2004). "Effect of somatostatin on nitric oxide production in human retinal pigment epithelium cell cultures." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(5): 1499-506.
- Ventura, AC, Bohnke, M, Loliger, C, Kuhn, P, Winter, R and Engelmann, K (1996). "[HLA typing of donor corneas with extended post mortem time]." *Ophthalmologie* 93(3): 262-7.
- Vinores, SA, Derevjani, NL, Mahlow, J, Hackett, SF, Haller, JA, deJuan, E, Frankfurter, A and Campochiaro, PA (1995). "Class III beta-tubulin in human retinal pigment epithelial cells in culture and in epiretinal membranes." *Exp Eye Res* 60(4): 385-400.

- Vollrath, D, Feng, W, Duncan, JL, Yasumura, D, D'Cruz, PM, Chappelow, A, Matthes, MT, Kay, MA and LaVail, MM (2001). "Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(22): 12584-9.
- von Recum, HA, Okano, T, Kim, SW and Bernstein, PS (1999). "Maintenance of retinoid metabolism in human retinal pigment epithelium cell culture." *Exp Eye Res* 69(1): 97-107.
- Waitkus-Edwards, KR, Martinez-Lemus, LA, Wu, X, Trzeciakowski, JP, Davis, MJ, Davis, GE and Meiningner, GA (2002). "alpha(4)beta(1) Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction." *Circ Res* 90(4): 473-80.
- Walsh, N, Valter, K and Stone, J (2001). "Cellular and subcellular patterns of expression of bFGF and CNTF in the normal and light stressed adult rat retina." *Exp Eye Res* 72(5): 495-501.
- Weaver, VM and Gilbert, P (2004). "Watch thy neighbor: cancer is a communal affair." *J Cell Sci* 117(Pt 8): 1287-90.
- West, KA, Yan, L, Miyagi, M, Crabb, JS, Marmorstein, AD, Marmorstein, L and Crabb, JW (2001). "Proteome survey of proliferating and differentiating rat RPE-J cells." *Exp Eye Res* 73(4): 479-91.
- Whitaker, JE, Haugland, RP and Prendergast, FG (1991). "Spectral and photophysical studies of benzo[c]xanthene dyes: dual emission pH sensors." *Anal Biochem* 194(2): 330-44.
- Willermain, F, Caspers-Velu, L, Nowak, B, Stordeur, P, Mosselmans, R, Salmon, I, Velu, T and Bruyns, C (2002). "Retinal pigment epithelial cells phagocytosis of T lymphocytes: possible implication in the immune privilege of the eye." *Br J Ophthalmol* 86(12): 1417-21.
- Wilt, SD, Greated, CJ, Lutz, DA and McLaughlin, BJ (1999a). "Mannose receptor is expressed in normal and dystrophic retinal pigment epithelium." *Exp Eye Res* 69(4): 405-11.
- Wilt, SD and McLaughlin, BJ (1999b). "Is another mannose receptor-like lectin present in retinal pigment epithelium?" *Curr Eye Res* 19(1): 1-3.
- Wood, JP and Osborne, NN (1998). "Expression of protein kinase C isoenzymes in cultured hooded rat retinal pigmented epithelial cells: comparison with dystrophic Royal College of Surgeons rat." *Curr Eye Res* 17(7): 757-60.
- Wright, SD and Silverstein, SC (1983). Overview: the function of receptors in phagocytosis. *Handbook of Experimental Immunology*. 41.1 - 41.14.
- Wu, X, Mogford, JE, Platts, SH, Davis, GE, Meiningner, GA and Davis, MJ (1998). "Modulation of calcium current in arteriolar smooth muscle by alpha5 beta3 and alpha5 beta1 integrin ligands." *J Cell Biol* 143(1): 241-52.
- Wu, X, Davis, GE, Meiningner, GA, Wilson, E and Davis, MJ (2001). "Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5beta 1 integrin requires signaling through focal adhesion proteins." *J Biol Chem* 276(32): 30285-92.
- Wu, Y, Singh, S, Georgescu, MM and Birge, RB (2005). "A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells." *J Cell Sci* 118(Pt 3): 539-53.
- Yagami, T, Ueda, K, Asakura, K, Nakazato, H, Hata, S, Kuroda, T, Sakaeda, T, Sakaguchi, G, Itoh, N, Hashimoto, Y and Hori, Y (2003a). "Human group IIA secretory phospholipase A2 potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in cultured rat cortical neurons." *J Neurochem* 85(3): 749-58.
- Yagami, T, Ueda, K, Asakura, K, Okamura, N, Sakaeda, T, Sakaguchi, G, Itoh, N, Hashimoto, Y, Nakano, T and Fujimoto, M (2003b). "Effect of Gas6 on secretory phospholipase A(2)-IIA-induced apoptosis in cortical neurons." *Brain Res* 985(2): 142-9.
- Yagami, T, Ueda, K, Asakura, K, Sakaeda, T, Hata, S, Kuroda, T, Sakaguchi, G, Itoh, N, Hashimoto, Y and Hori, Y (2003c). "Porcine pancreatic group IB secretory phospholipase A2 potentiates Ca<sup>2+</sup> influx through L-type voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels." *Brain Res* 960(1-2): 71-80.
- Yamaguchi, K (1993). "[Progress in retinal transplantation]." *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 97(5): 555-62.
- Yang, WC, Hollenberg, MJ and Wyse, JP (1978). "Morphology of the retinal pigment epithelium in the vitamin A deficient rat." *Virchows Arch B Cell Pathol* 27(1): 7-21.
- Yasumoto, F, Negishi, T, Ishii, Y, Kyuwa, S, Kuroda, Y and Yoshikawa, Y (2004). "Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel in primary cultured mouse midbrain neural network." *Cell Mol Neurobiol* 24(6): 877-82.
- Ye, J, Zhang, C and Ryan, SJ (1995). "[Long-term follow-up of allotransplantation of retinal pigment epithelial cells in rabbit with special reference to morphological studies]." *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 31(2): 109-13.
- Young, RW (1967). "The renewal of photoreceptor cell outer segments." *J Cell Biol* 33(1): 61-72.
- Young, RW and Bok, D (1969). "Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process." *J Cell Biol* 42(2): 392-403.
- Young, RW (1971). "Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey." *J Ultrastruct Res* 34(1): 190-203.
- Zadunaisky, JA and Lande, MA (1972). "Calcium content and exchange in amphibian skin and its isolated epithelium." *Am J Physiol* 222(5): 1309-15.
- Zarbin, MA (1998). "Age-related macular degeneration: review of pathogenesis." *Eur J Ophthalmol* 8(4): 199-206.
- Zareparsy, S, Branham, KE, Li, M, Shah, S, Klein, RJ, Ott, J, Hoh, J, Abecasis, GR and Swaroop, A (2005a). "Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration." *Am J Hum Genet* 77(1): 149-53.
- Zareparsy, S, Buraczynska, M, Branham, KE, Shah, S, Eng, D, Li, M, Pawar, H, Yashar, BM, Moroi, SE, Lichter, PR, Petty, HR, Richards, JE, Abecasis, GR, Elner, VM and Swaroop, A (2005b). "Toll-like receptor 4 variant D299G is associated with susceptibility to age-related macular degeneration." *Hum Mol Genet* 14(11): 1449-55.
- Zhang, X and Bok, D (1998). "Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39(6): 1021-7.
- Zhao, S, Rizzolo, LJ and Barnstable, CJ (1997). "Differentiation and transdifferentiation of the retinal pigment epithelium." *Int Rev Cytol* 171: 225-66.
- Zhou, YD, Yan, M and Zhang, JJ (2003). "[The response of bFGF, FGFR1, Bcl-2 and caspase-3 to visible light in cultured human retinal pigment epithelium cells]." *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 39(11): 655-9.
- Zinn, K and Marmor, MF (1979). *The Retinal Pigment Epithelium*. Harvard University Press.

## 8. Anhang

### 8.1. Formulierungen der Zellkulturmedien

Komponenten	F99	D-MEM	MEM	Komponenten	F99	D-MEM	MEM
Invitrogen Order No.	21700+	41960	31095	Invitrogen Order No.	21700+	41960	31095
	31100				31100		
	[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]		[mg/L]	[mg/L]	[mg/L]
Anorganische Salze				Aminosäuren			
CaCl <sub>2</sub> (anhyd.)	116,6	200	200	L-Alanine	140,5		
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,00125			L-Arginine · HCl	7,5	84	126
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,415			L-Asparagine · H <sub>2</sub> O	21,5		
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	0,36	0,1		L-Aspartic Acid	17,55		
KCl	311,8	400	400	L-Cysteine HCl · H <sub>2</sub> O	13		
MgCl <sub>2</sub> (anhyd.)	28,61			L-Cystine · 2HCl	44,85	63	24
MgSO <sub>4</sub> (anhyd.)	49	97,6	97,6	L-Glutamic Acid	123		
NaCl	7199,5	6400	6800	L-Glutamine	28,75	580	292
NaHCO <sub>3</sub>		3700	2200	Glycine	21,5	30	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhyd.)	71			L-Histidine · HCl · H <sub>2</sub> O	5	42	42
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	70	125	125	L-Hydroxyproline	22		
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,43			L-Isoleucine	36,5	105	52
Andere	5			L-Leucine	53,25	105	52
Adenine Sulphate	0,5			L-Lysine · HCl	9,75	146	73
Adenosine-5-triphosphate	0,1			L-Methionine	15	30	15
Adenosine-5-phosphate	0,1			L-Phenylalanine	37,25	66	32
Cholesterol	0,25			L-Proline	17,75		
Deoxyribose	1401			L-Serine	21	42	
D-Glucose	0,025	4500	1000	L-Threonine	6	95	48
Glutathione (reduced)	0,15			L-Tryptophan	32,9	16	10
Guanine · HCl	2,585			L-Tyrosine	9	72	36
Hypoxanthine · Na	0,04			L-Valine		94	46
Linoleic Acid	0,105			Vitamine			
Lipoic Acid	10,6			Ascorbic Acid	0,005		
Phenol Red	0,0805	15	10	Biotin	0,05		
Putrescine 2HCl	0,25			Calciferol	0,255		
Ribose	25			D-Ca Pantothenate	7,25	4	1
Sodium Acetate	55			Choline Chloride	0,655	4	1
Sodium Pyruvate	0,35	110		Folic Acid	9,025	4	1
Thymidine	0,15			i-Inositol	0,005	7,2	2
Thymine	10			Menadione	0,0125		
Tween 80™	0,15			Niacin	0,0325		
Uracil	0,17			Niacinamide	0,025	4	
Thiamine HCl	0,05	4	1	Para-aminobenzoic Acid	0,0125		1
Vitamin A (acetate)	0,7			Pyridoxal HCl	0,0425		1
				Pyridoxine HCl	0,025	4	
				Riboflavin	0,155	0,4	0,1

## 8.2. Überblick der OS Isolationen

Tab. :Proteinmenge und OS Partikelzählung sind für die jeweiligen Präparationen bestimmt worden. Die Zusammenfassung am Ende bezieht sich auf die Präparationen 7 bis 20 mit jeweils 5 Homogenisationszyklen (↑↓). Insgesamt wurden über 3000 Retinae für die Doktorarbeit präpariert.

Übersicht der OS Präparationen					
Nr.	Anzahl ↑↓	Anzahl Retinae	Protein [µg] /Retina	OS [x10 <sup>6</sup> ] /Retina	OS [x10 <sup>6</sup> ] /Protein [µg]
1	1	60	4,4	9,0	2,0
2	1	50	6,0	21,0	3,5
3	1	60	4,2	6,3	1,5
4	3	70	4,5	22,0	4,9
5	3	60	3,4	1,4	0,4
6	4	80	61,8	48,0	0,8
7	5	67	26,1	26,5	1,0
8	5	95	56,9	106,0	1,9
9	5	79	59,8	63,5	1,1
10	5	85	71,6	71,0	1,0
11	5	77	75,2	123,5	1,6
12	5	180	53,9	71,2	1,3
13	5	90	61,8	67,6	1,1
14	5	100	59,3	60,0	1,0
15	5	90	68,6	78,3	1,1
16	5	105	61,0	117,0	1,9
17	5	80	53,8	111,1	2,1
18	5	121	51,0	90,9	1,8
19	5	1000	93,8	132,2	1,4
20	5	540	97,0	150,9	1,6
		Summe 2709	Mittelwert 63,6 ±17,75 SD	Mittelwert 90,7 ± 34,0 SD	Mittelwert 1,4 ± 0,38 SD

## 8.3. Zusammenfassung: Kontroll-RPE und RCS-RPE

Phagozytose [ ± SEM %] (4 h)		Kontroll-RPE		RCS-RPE	
		Aufnahme	Anbindung	Aufnahme	Anbindung
FCS	Baseline	100 ± SEM	100 ± SEM	100 ± SEM ***	100 ± SEM ***
	+ 5 % FCS	221 ± 6 (SV) 171 ± 11 % (PK)	357 ± 4 (SV)	78 ± 4	210 ± 6
	+ 10 % FCS	242 ± 12 (SV) 171 ± 11 % (PK)	295 ± 10 (SV)	60 ± 12	276 ± 10
Nifedipin	1 µM Nifedipin (30 min)	87 ± 3 (SV) 81 ± 3 (PK) 64 (SV, 1 h, n=1)	85 ± 4 (SV)	165 ± 4	256 ± 4
	+ 5 % FCS	137 ± 12 % (PK)		120 ± 4	279 ± 2
	2 µM Nifedipin	77 ± 6 (PK) 20 (SV, 1 h; n=1)		162 ± 13	303 ± 10
	+ 5 % FCS			123 ± 3	303 ± 4
	5 µM Nifedipin	54 ± 14 (SV) 74 (PK, 1 h; n=1)	51 ± 18 (SV)	147 ± 13 46 ± 19 (12 h, n=1)	134 ± 7 48 ± 24 (12 h, n=1)
+ 5 % FCS	184 ± 6 (SV)	267 ± 2 (SV)			
Herbimycin A	Herbimycin A (12 h)	73 ± 7 (SV) 67 (SV, 12 h, n=1) 72 (SV, 1 h, n=1) 69 ± 9 (PK) 82 (PK, 1 h, n=1)	102 ± 6 (SV) 80 (SV, 12h, n=1)	69 ± 8 8 ± 54 (12 h, n=1)	76 ± 10 10 ± 50 (12 h, n=1)
	+ 5 % FCS	104 ± 6 (SV) 114 ± 14 (PK)	106 ± 9 (SV)	60 ± 6	104 ± 12
	+ 10 % FCS	93 ± 10 (SV)	137 ± 6 (SV)		
	+ 1 µM Nifedipin	68 ± 8 (SV) 65 (SV, 12 h, n=1) 53 (SV, 1 h, n=1) 73 (PK, 1 h, n=1)	66 ± 8 (SV) 80 (SV, 12 h, n=1)		
bFGF	10 ng/ml bFGF (30 min)	96 ± 13 (SV) 84 ± 10 (SV, 1 h) 93 (PK, 1 h, n=1)	78 ± 14 (SV)	169 ± 9 156 ± 12 (24 h bFGF, n=1) 135 ± 18 (24 h bFGF, 12 t, n=1)	141 ± 7 170 ± 14 (24 h bFGF, n=1) 145 ± 16 (24 h bFGF, 12 t, n=1)
	+ Herbimycin	45 (SV, 1 h, n=1) 79 (PK, 1 h, n=1)			
	100 ng/ml bFGF (30 min)	94 ± 9 (SV) 66 ± 3 (SV, 1 h)	79 ± 10 (SV)	194 ± 5 208 ± 14 (24 h bFGF, n=1)	181 ± 8 237 ± 17 (24 h bFGF, n=1)
	+ Herbimycin			117 ± 11 (n=1)	118 ± 15 (n=1)
Antikörper (Ak)	IgG-Ak (10 µg/ml)	100 ± SEM	100 ± SEM		
	Mer-Ak (10 µg/ml)	66 ± 5 (SV) 60 ± 5 (PK)	72 ± 7 (SV)		
	Gas6-Ak (10 µg/ml)	65 ± 5 (SV) 55 ± 4 (PK)	78 ± 7 (SV)		
	IgG-Ak + 5% FCS	100 ± SEM	100 ± SEM		
	Mer-Ak + 5% FCS	87 ± 4 (SV)	87 ± 6 (SV)		
Gas6-Ak + 5% FCS	77 ± 12 (SV)	100 ± 18 (SV)			

LEGENDE:  
SV = humanes SV40-RPE; PK = humanes primäres RPE; h = Stunden; min = Minuten; t = OS Inkubationszeit (k.A. = 4 h);  
Werte > 100 %: † < 125 %, †† < 150 %, ††† < 200 %; †††† ≥ 200 %;  
Werte < 100 %: ‡ > 80 %. ‡‡ > 70 %, ‡‡‡ > 60 %, ‡‡‡‡ ≤ 60 %  
kein Einfluss: ↔

## 8.4. Veröffentlichungen von Teilen der Arbeit

Dobilei, V., J. Bednarz, M. Valtink, V. Zubaty, M. O. Karl, K. Engelmann and H. J. Schaefer (2002). Serum-Free Cultivation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells for Transplantation ARVO Meeting Abstracts. Invest Ophthalmol Vis Sci. 43: E-Abstract 3450.

Karl, M. O., K. Engelmann and O. Strauss (2002). Involvement of Ca<sup>2+</sup>-Channels and Src Tyrosine Kinases in the Regulation of Photoreceptor Outer Segment (ROS) Phagocytosis By Retinal Pigment Epithelial (RPE) Cells. ARVO Meeting Abstracts 43(12): 4578.

Valtink, M., M. O. Karl, J. Bednarz and K. Engelmann (2002). Short-Term Influence of Culture Media and Supplements on Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments by Cultured Human Retinal Pigment Epithelium. ARVO Meeting Abstracts 43(12): 716.

Karl, M. O., M. Valtink, J. Bednarz and K. Engelmann (2001). Influence of Cell Culture Conditions on Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments by SV40-Transfected Retinal Pigment Epithelium. Ophthalmologe 98 (Suppl. 1): S85.

## 8.5. Erklärung

### Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens) Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht in einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Mike O. Karl

Hamburg 2005

## 8.6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
aFGF=FGF-1	Acid Fibroblast Growth Factor
bFGF=FGF-2	Basic Fibroblast Growth Factor
AK	Antikörper
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
BSA	bovines Serumalbumin
$[Ca^{2+}]_{i/e}$	intrazelluläre /extrazelluläre Kalziumkonzentration
ChCM	Chorioidea konditioniertes Medium
CM(F)	mit (ohne) Kalzium und Magnesium (CM-free)
d	Tage
(D)MEM	(Dulbecco's Modifiziertes) Minimum Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F99	1:1 Mediummischung aus Ham's F12 und Medium 199
FACS	Durchflusszytometer (engl. fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FGFR	Acid Fibroblast Growth Factor Rezeptor
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
g	Erdbeschleunigung (Gravitation)
h	Stunde(n) (engl. hour(s))
Ig	Immunglobin
kD	Kilodalton
ChCM	Chorioidea konditioniertes Medium
log	logarithmisch
min	Minuten
Mw	Molekulargewicht (ENGL: molecular weight)
OS	Photorezeptoraußensegmente (engl.: photoreceptor outer segments)
PBS	Phosphate-buffered saline-Dulbecco
RCS	Royal College of Surgeons
RE	Retinaextrakt
(h)RPE	(humanes) retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
sec	Sekunden (engl. second(s))
SEM	Standardfehler des Mittelwert (engl. standard error of the mean)
(h)SFM	(humanes) serumfreies Medium (engl. serum free media)
SNAFL <sup>®</sup>	Seminaphthofluoreszein
SV40	Semianvirus No. 40
Tab.	Tabelle
w/v	Gewicht pro Volumen (Kilogramm / Liter; engl. weight per volume)

## 8.7. Danksagung

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Katrin Engelmann für die freundliche Integration und die hoch motivierende Arbeitsatmosphäre.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß, der mich erst per Email und später über die Promotion hinaus mit persönlichen Gesprächen in und durch die Physiologie des RPE navigierte. Vor allem bin ich ihm sehr dankbar für seine in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und Förderung.

Ganz besonders herzlich möchte ich meiner Betreuerin Dipl.-Ing. Monika Valtink für die fundierte Einweisung in Zellkulturtechniken danken, womit alles begann. Ihre großzügige Unterstützung, Begeisterungsfähigkeit und Diskutierfreudigkeit haben weit über die Grenzen dieser Arbeit wesentlich zum Gelingen meiner Arbeiten beigetragen.

Danken möchte ich Dr. rer. nat. Jürgen Bednarz, der gerade bei den grundlegenden Hindernissen jederzeit mit zahlreichen Ratschlägen mein wissenschaftliches Vorgehen förderte.

Zu besonderem Dank bin ich meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Katrin Engelmann verpflichtet, die mich in ihre Arbeitsgruppe aufnahm und mir eine aktive wissenschaftliche Teilnahme und Freiheit von Anfang an ermöglichte. Für Ihre großzügige in jeder Hinsicht gewährte fachliche und menschliche Unterstützung kann ich mich gar nicht genug bedanken. Vielen lieben Dank!

Ich danke Prof. Dr. med. Schäfer, seinen Mitarbeitern und dem Institut für Pathologie, UKE Hamburg für die Unterstützung bei der Elektronenmikroskopie von Photorezeptoraussensegmenten.

Ein Dank an alle Institutsangehörigen insbesondere Christel Kieck, Steffen Peters, Dr. med. Marc Schellhorn und dem Photolabor der UKE Augenklinik, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ebenso danke ich den Laboren von Prof. Dr. med. Schaudig, Prof. Dr. med. Rinninger; Dr. rer. nat. Boris Fehse und Prof. Dr. rer. nat. Melitta C. Schachner für die Nutzung diverser Laborgeräte.

Die großzügige finanzielle Unterstützung der Werner Otto Stiftung, Hamburg hat erst die Arbeiten zu meiner Promotion ermöglicht. Der Besuch diverser Kongresse wurde mir von Pro Retina Deutschland e.V. finanziert und befähigte mich schon zu Beginn der Promotion Kontakte zu knüpfen und Gespräche zu führen, die für meinen Werdegang ausschlaggebend sind und waren.

Ich möchte Dr. rer. nat. Sönke Wimmers danken für die grandiose gemeinsame berufliche Zeit während der schriftlichen Ausarbeitung dieser Promotion sowie für seine Manuskriptkorrekturen.

Ein herzlichen Dank möchte ich allen meinen Freunden widmen, insbesondere Till, der meinen Blick häufig auf die wesentlichen Dinge des Lebens zu lenken wusste. Und auch Sandra, die von unserer beginnenden Freundschaft trotz Ausfall einer Asienrundreise nicht abließ. Ich danke Tina, Thomas, Jochi und Rasputin für die gemeinsame Zeit.

Einen riesiger Dank an Melanie, die mit der Korrekturhilfe und insbesondere ihrer Unterstützung, Rückhalt sowie Verständnis für meine Belange wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern, insbesondere meiner Mutter, und auch Horst sowie meiner Oma möchte ich danken für Ihre herzliche Unterstützung sowie den persönlichen und finanziellen Rückhalt.

## 8.8. Lebenslauf

Mike Oliver Hans Rüdiger Karl	geboren am 26. September 1976
in Kassel	Sohn von Marion (geb. Scholl am 07.12.1950) und Hans-Joachim Karl (* 11.03.1947; † 23.09.2002)
1996 nach dem Abitur	am Gymnasium Herderschule in Kassel Beginn des Studiums der Humanmedizin in Hamburg
im Jahr des Millennium	kennen lernen von Prof. Dr. med. Katrin Engelmann
mündete in 2001	im Promotionsstipendium der Werner-Otto Stiftung „Phagozytose des retinalen Pigmentepithelium“ und einer Kooperation mit Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß
sowie in 2002	als Stipendiat der Herbert-Funke Stiftung bei „Mort“ (Prof. Mortimer Civan; Upenn, Philadelphia) „Elektrophysiologie der Kammerwasserregulation“
noch vor 2004	das „PJ“ (Praktische Jahr): Chirurgie (Krankenhaus Eilbek), Innere Medizin (Universitätsklinik Hamburg: Onkologie; Nephrologie), und Augenheilkunde (UniSpital Zürich) begann
dann Ende 2004	der Studienabschluss eine halbe wissenschaftliche Mitarbeiterstelle bei Prof. Olaf Strauß ermöglichte „Pathophysiologie retinaler Erkrankungen“
um in 2005	die Promotion zu beenden.
dieses Jahr	Heirat mit Melanie Siekmann (geb. 21.10.1975) [MK] <sup>2</sup>
ab 2006	Senior Fellow für ein Forschungsprojekt in Seattle an der University of Washington mit Prof. Tom Reh, PhD