

Aus dem Hornhautlabor
der Augenlinik des
Universitätskrankenhauses Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. G. Richard

Immunologische Charakterisierung von humanen retinalen Pigmentepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Annett Reichel

aus Rostock

Hamburg 1999

Angenommen von dem Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: *18. Febr. 1959*

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität Hamburg

Sprecher : *Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß*

Referent : *Prof. Dr. K. Engelmann*

Koreferent : *Prof. Dr. A. Richard*

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig 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 entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich möchte Frau Prof. Dr. K. Engelmann für die interessante Aufgabenstellung sowie die Überlassung des wissenschaftlichen Themas ganz herzlich danken. Insbesondere gilt mein Dank Herrn Dr. Bednarz, der mich bei der Durchführung der experimentellen Versuche sehr unterstützt und mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ganz herzlichen Dank auch an alle Mitarbeiter des Hornhautlabors, insbesondere Frau M. Valtink, der Fotoabteilung und des histologischen Labors, die mir mit ihren wertvollen Ratschlägen und Hilfeleistungen immer geholfen haben. Ferner möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei Frau Y. Gertz sowie die fachkompetente Betreuung bei der Beurteilung der Gewebeschnitte bei Herrn Prof. Schäfer (Pathologisches Institut UKE) bedanken. Ich fühlte mich bei der Durchführung und Erstellung meiner Arbeit von allen bereits Genannten sehr gut betreut.

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	5
1.1	Das Retinale Pigmentepithel (RPE) <i>in vivo</i>	5
1.2	Morphologie und Funktion der RPE Zellen	7
1.3	Das Retinale Pigmentepithel <i>in vitro</i>	8
1.4	Matrixkomponenten und Intermediärfilamente	9
1.5	RPE und Erkrankungen	10
1.6	Das humane Endothel, aus der Nabelschnurvene (HUVEC)	11
1.7	Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.2	Methoden	17
2.2.1	Isolierung und Kultivierung von RPE	17
2.2.2	Isolierung und Kultivierung von HUVEC	20
2.2.3	Immunhistochemische Färbungen	22
2.2.4	Färbungen von Gewebeschnitten	26
2.2.5	Herstellung von Zellextrakten und Proteinbestimmung nach Lowry, Bradford und Smith	30
2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotverfahren	32
2.2.7	Dokumentation der Ergebnisse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Zellkultur	37
3.1.1	Morphologie und Wachstumsverhalten der RPE Zellkultur	37
3.1.2	Morphologie und Wachstumsverhalten der HUVEC Zellkultur	40
3.2	Qualitativer immunologischer Proteinnachweis an Zellkulturen und Gewebeschnitten	41
3.2.1	Matrixproteine	42
3.2.2	Zellassozierte Proteine	52
3.2.3.	Intermediärfilamente	59
3.2.4.	Neuronen spezifische Enolase (NSE)	66
3.2.5	Antikörper 9.3.E	69
3.2.6	Zusammenfassung der Färbeergebnisse	73
3.3	Quantitativer immunhistochemischer Proteinnachweis	74
3.3.1	Silbernitratfärbung	74
3.3.2	Matrixkomponenten	75
3.3.2.1	Fibronectin	75
3.3.2.2	Laminin	76
3.3.2.3.	Kollagen IV	77

3.3.3.	Kinetik der Produktion der Matrixkomponente Fibronectin	78
3.3.4.	Antikörper 9.3.E	84
4.	Diskussion	85
4.1.	Diskussion der Methoden	85
4.1.1.	Isolierung	85
4.1.2.	Kultivierung und Morphologie	85
4.1.3.	Identifizierung beider Zellarten	86
4.1.4.	Immunhistochemische Färbungen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	87
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	88
4.2.1.	Extrazelluläre Matrix (ECM)	88
4.2.2.	Zellassozierte Proteine	90
4.2.3.	Intermediärfilamente	91
4.2.4.	NSE	94
4.2.5.	9.3.E	95
4.2.6.	<i>In vivo in vitro</i> Vergleich	96
4.3.	Ausblick	97
5.	Zusammenfassung	98
6.	Literatur	99

Abkürzungen

AK	Antikörper
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
AP	Alkalische Phosphatase
AT III	Antithrombin III
BCA	Bicinchonin Säure (bicinchonin acid)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Serumalbumin aus dem Rind (bovine serum albumin)
CNV	choroidale Neovaskularisation
CRALBP	cellular retinaldehyde binding protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECGF	Endothelzellen Wachstumsfaktor (endothelial cell growth factor)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F99	1:1 Mediummischung aus Ham's F12 und Medium 199
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor)
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
g	Erdbeschleunigung
GAM	Immunglobulin aus der Ziege gegen Maus (goat anti mouse)
GFAP	glial fibrillary acidic protein
HCEC	Humane korneale Endothelzellen (human corneal endothelial cells)
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase)
HUVEC	Humane vaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (human umbilical vascular endothelial cells)
IF	1:1 Mediummischung aus Iscove's modifiziertem Dulbeccos Medium und Ham's F12
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IPM	Interphotorezeptormatrix
kD	kilo Dalton
LSAB-2	Labelled Streptavidin Biotin-2
LWM	low molecular weight marker
MG	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau tetrazolium
N-CAM	neural cell adhesionsmolecule
NCS	Serum vom neugeborenen Kalb (newborn calf serum)

NSE	Neuronenspezifische Enolase (neuron specific enolase)
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
RBP	Retinol bindendes Protein
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate-buffered-saline)
PBT	PBS + 0,1% Tween 20
PVP	Polyvidon-Iod
PVR	Proliferative Vitreoretinopathie
RM	Rainbow marker
RPE	Retinales Pigmentepithel
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecyl Sulfate)
SNV	Subretinale Neovaskularisation
TGF	transforming growth factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
UEA-1	Ulex europaeus Agglutinin 1
UKE	Universitätskrankenhaus-Eppendorf
vWF	von Willebrand Faktor, Faktor VIII

1. Einleitung

1.1. Das Retinale Pigmentepithel (RPE) *in vivo*

Die Netzhaut des menschlichen Auges ist ein 0,1 bis 0,5 mm dünnes, lichtdurchlässiges Gewebe, mit dem im histologischen Schnitt (Abbildung 1) dargestellten Schichtenaufbau. Die äußere Schicht bildet das RPE, die inneren, wesentlich komplexer aufgebauten Strukturen, werden als neurosensorische Netzhaut bezeichnet.

Die neurale Retina und das RPE haben einen gemeinsamen, ektodermalen Ursprung (Vinores et al., 1995). Das RPE entwickelt sich in der dritten Schwangerschaftswoche aus dem äußeren Ektoderm (Coulombre, 1979). Ihm lagert sich nur wenig später die neurosensorische Retina aus dem eingestülpten inneren Ektoderm an.

Die dunkelbraune Farbe des RPE entsteht durch das Melanin, welches intrazellulär im Laufe der Entwicklung synthetisiert wird. Zunächst werden Prämelanosomen mit einer im Vergleich zu ausgereiften Melanosomen erhöhten Tyrosinaseaktivität gebildet, in denen dann das Melanin mittels Tyrosinase entsteht. Sind die Melanosomen ausgereift und voll pigmentiert, nimmt die Tyrosinaseaktivität ab und reife Melaningranulae verbleiben im Zellinneren (Zhao et al., 1997). Dieser Prozeß findet seinen Abschluß vor Geburt.

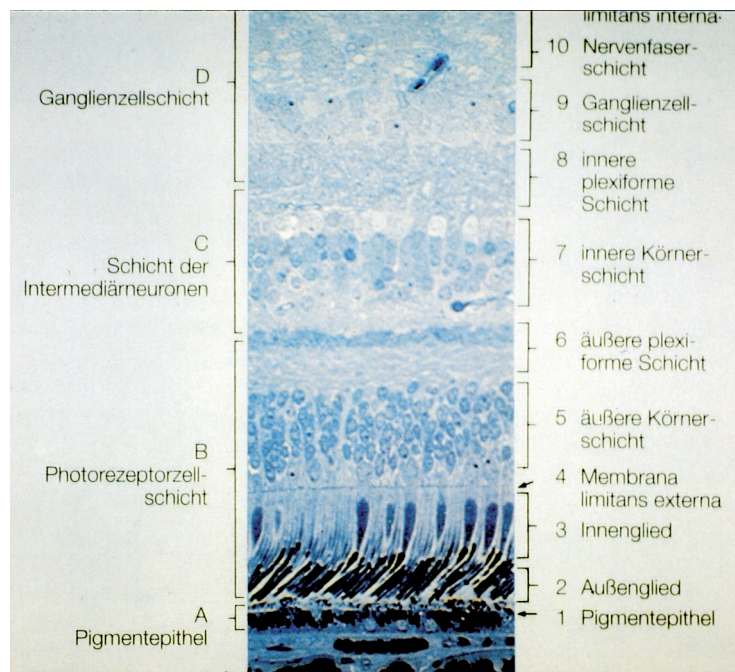


Abbildung 1: Histologischer Schnitt durch die Netzhaut mit basal angrenzendem retinalen Pigmentepithel (aus Atlas der Augenkrankheiten, D.J.Spaltan et al., 2. Auflage, et al., 1996, S. 313)

Das RPE bildet die äußere Schicht der Retina und befindet sich zwischen den apikal gelegenen Außensegmenten der Photorezeptoren und der basal liegenden Aderhaut. Es erstreckt sich von der Austrittsstelle des Nervus Opticus über die Ora serrata und endet in der pars plana des Ziliarkörpers. Als Erstbeschreiber der Morphologie des RPE 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 (Bairati und Orzales, 1963, Lerche, 1963 a,b, Hogan, 1972) und wie folgt beschrieben. Es handelt sich beim RPE um einen einschichtigen Zellrasen, bestehend aus hexagonalen Epithelzellen, der durch einen hohen Gehalt an Pigment (Melanin) charakterisiert ist.

Größe, Form und Melaningehalt des RPE variieren abhängig von seiner Lage innerhalb des Auges und vom Alter. So beträgt die Größe einer RPE Zelle am hinteren Augenpol bei jugendlichen Erwachsenen $14 \times 14 \mu\text{m}$ (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 Melaningehalt in der Makulazone, der dort von Anfang an höher ist als in der Peripherie, nimmt zu (Usher, 1906). Daher erscheint die Makula bei der Fundusspiegelung dem Kliniker dunkler. Während das RPE bis zum 2. Lebensjahr eine Fläche von 8 mm^2 einnimmt, steigt seine Fläche durch Wachstumsprozesse bis zum 45. Lebensjahr auf 11 mm^2 . Die Anzahl der Zellen in dieser Zeit beträgt gleichbleibend ca. 400000 (Vinores et al., 1995), da sie *in vivo* mitotisch inaktiv sind (Campochiaro et al., 1991).

1.2 Morphologie und Funktion der RPE Zellen

Das RPE ist eine der wichtigsten Zellagen im visuellen System und übernimmt vielfältige Funktionen. Es ist, wie die meisten einfachen Epithelien, durch eine Schicht dichtgepackter Zellen organisiert, die angrenzende Gewebebestandteile trennt, wie in der Abbildung 2 zu erkennen ist. Die apikale, basale und laterale Zelloberfläche weisen unterschiedliche Funktionen auf (Mircheff et al., 1990).

Die apikale Oberfläche der RPE Zellen besteht aus unterschiedlich langen Mikrovilli und Mikroplicae, die die Außensegmente der Photorezeptoren umgeben (Matsumoto et al., 1990). Die Aufgabe der Villi besteht darin, die abgeschilferten Außensegmente der Photorezeptoren zu phagozytieren und durch Bildung von Phagosomen den Abtransport der Stoffwechselprodukte zu gewährleisten (Spitznas und Hogan, 1970, Feeney, 1973).

Die Interphotorezeptormatrix (IPM) befindet sich zwischen den Photorezeptoren und dem RPE. Sie wird durch den ständigen Erneuerungsprozeß der Außensegmente der Photorezeptoren und deren Phagozytose kontinuierlich umgebaut. Zur Photorezeptorregeneration synthetisiert das RPE basic fibroblast growth factor (bFGF) (Schweigerer et al., 1987) und sezerniert diesen in die IPM (Faktorovich et al., 1990).

Desweiteren zeigt bFGF einen signifikanten Effekt auf die Differenzierung des RPE, der sich in einer Inhibierung des Wachstums und einer Stimulierung der Melaninproduktion äußert (Campochiaro und Hackett, 1993).

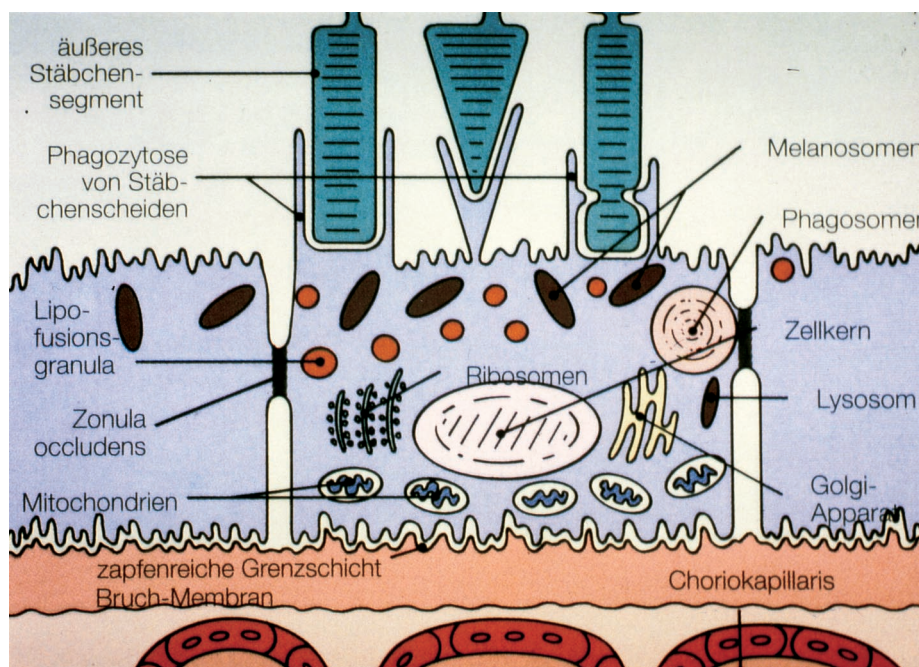


Abbildung 2: Inter- und intrazelluläre Anatomie der RPE Zelle (aus Atlas für Augenerkrankungen, D.J.Spaltan et al., 1996, S. 314)

Als basale Grenze fungiert die pentalamelläre Bruch'sche Lamina, die über Hemidesmosomen mit dem RPE verbunden ist. Die Basalmembran der RPE Zellen hat Einfältelungen, die sich mehr als 1µm in das Zytoplasma der Zelle erstrecken und zur darunterliegenden Bruch'schen Schicht einen Abstand von ca. 0,1µm aufweisen. Die Fibrillen der Basalmembran reichen in die Bruch'sche Lamina und gewährleisten die Anheftung der RPE Zellen.

Den lateralen Kontakt zwischen den RPE Zellen bilden tight-junctions oder auch zonulae occludentes, sowie Desmosomen und zonulae adherentes. Die zonulae occludentes bilden das morphologische Korrelat der äußeren Blut-Retina-Schranke, die nur niedermolekulare Substanzen von der Aderhaut in die Netzhaut passieren läßt (Shakib et al., 1972). Diese lateralen Zellkontakte stellen eine selektive Permeabilitätsbarriere des RPE dar. Die Desmosomen fungieren hierbei nicht als eine Barriere, sondern sind an interzellulären Adhäsionsprozessen beteiligt und treten diskontinuierlich auf (Marshall et al., 1992).

Die zonulae adherentes gewährleisten die Erhaltung der polygonalen Zellform. Sie sind bei der Bildung eines Netzes aus dem Mikrofilament Aktin mitbeteiligt (Miceli and Newsome, 1996).

Eine Eigenschaft des RPE ist seine Pumpfunktion, wobei es die Flüssigkeit aktiv aus dem subretinalen Spalt in die Chorioidea transportiert und auf diese Weise eine Adhäsion zwischen RPE und Retina schafft. Der Transport von Flüssigkeit aus dem Glaskörper über die Retina in die Chorioidea erfolgt über ein Ionen-Transport-System mit Hilfe von Enzymen, wie der Na-K-ATPase und der alkalischen Phosphatase (McLaren et al., 1993). Diese befinden sich im apikalen Bereich der Zelle. Eine spezifische epitheliale Eigenschaft des RPE ist seine Polarität, die sich durch die veränderte Proteinzusammensetzung der apikalen und basalen Membranen auszeichnet und zur Aufrechterhaltung des Wasser- und Ionenhaushaltes der Zelle dient.

Zu den optischen Funktionen des Melanins gehört die Absorption von Licht und die Reduktion der Streustrahlung, die durch das einfallende Licht verursacht wird.

Sarna (1992) postulierte die protektive Rolle des Melanins, welches redoxaktive Metallionen bindet und so in einen effizienter Entgiftungsprozeß eingeht. Am retinoiden Zyklus ist das RPE beteiligt durch die Synthese und Speicherung von Retinylestern, der Isomerisation von all-trans-Retinoiden zu 11-cis-Retinoiden, der Umwandlung von Retinol zu Retinal und dem Transport der Retinoide (Flood et al., 1983; Flannery et al., 1990).

1.3. Das Retinale Pigmentepithel *in vitro*

Während das RPE *in vivo* nur wenig Proliferationspotential aufweist, wird unter pathologischen Bedingungen Zellproliferation gefunden. Bei okulären Degenerationen und Wundheilungsstörungen (Machemer und Laqua; 1975) *in vivo* wird ebenfalls ein erneutes Zellwachstum beschrieben.

Die Zellkultur bietet ein Modell zum Studium spezieller Funktionen und Charakteristiken des RPE unter kontrollierten Bedingungen. Dabei sind bestimmte Anforderungen an die kultivierte Zelle, wie der Erhalt der Vitalität, der Funktion und des Differenzierungsgrades, zu stellen. RPE Zellen formen sich zu einem Monolayer hexagonalen Zellen und weisen als epitheliales Charakteristikum

ein Keratin-haltiges Zytoskelett auf. Durch die Subkultivierung verlieren humane RPE Zellen ihren differenzierten Phänotyp und viele ihrer epithelialen Eigenschaften. So sinkt der Melaningehalt der Zelle und die polarisierte, kopfsteinpflasterartige Morphologie innerhalb des Monolayers geht verloren. Es bilden sich fibroblastoide, elongierte Zellen mit zytoplasmatischen Ausläufern, die mehrschichtig wachsen (Davis et al., 1995). Bei der Überführung des RPE in die Zellkultur beginnen die Zellen zu proliferieren (Campochiaro und Hackett, 1993). Itoh und Eguchi (1986) konnten nachweisen, daß RPE Zellen, die *in vitro* transdifferenzieren, die Fähigkeit zu einem verstärkten Wachstum besitzen.

Die Heterogenität des RPE *in vitro* wird durch die artifizielle Umgebung verursacht. Dabei kommt es zu einem Mangel an Komponenten und Enzymen, welche notwendig sind zur Differenzierung der Zellen. Desweiteren modulieren veränderte Medienzusammensetzungen oder Substrate das Erscheinungsbild der Zellen zu mehr oder weniger epitheloiden Zellen im Laufe der Subkultivierung (Burke et al., 1996).

Die unterschiedliche Herkunft des Spendergewebes führt ebenfalls zu physiologischen Variationen zwischen den Zellkulturen (Dunn et al., 1996).

1.4 Matrixkomponenten und Intermediärfilamente

Jede als Monolayer wachsende Zelle bildet *in vivo* und *in vitro* eine extrazelluläre Matrix (ECM). Die extrazelluläre Matrix hat verschiedene Funktionen, die die Differenzierung (Sieber-Blum et al., 1981, Loring et al., 1982), die Proliferation (Gospodarowicz et al., 1980), die Adhäsion (Birdwell et al., 1978, Vlodavsky et al., 1979) und die Chemotaxis (Gauss-Mueller et al., 1980) der anhaftenden Zellen beeinflussen. RPE Zellen sind in der Lage, eine Vielzahl von verschiedenen ECM Komponenten zu synthetisieren und durch deren unterschiedliche Zusammensetzung zu phänotypischen Veränderungen in der Zellkultur und *in vivo* beizutragen. Die basolateral gebildete ECM besteht aus Kollagen I, II, III und IV, Fibronektin und Laminin (Campochiaro et al., 1986).

Kultivierte RPE Zellen sind in der Lage, dieselben Komponenten zu bilden und abzugeben (Campochiaro et al., 1986; Yamakawa et al., 1987, Martini et al., 1992). Es wurde von Sieber-Blum et al. (1981) postuliert, daß die ECM bei der Zelladhäsion eine Rolle spielt. Als Vermittler für die Adhäsion dienen sogenannte Integrine, die als Zelloberflächenadhäsionsmoleküle fungieren. Integrine haben eine Rezeptorfunktion, die ECM Proteine erkennen und binden können. Es wurde festgestellt, daß die Integrinrezeptoren nicht nur mit extrazellulären Matrixbestandteilen, sondern auch mit Zytoskelett-assoziierten Proteinen interagieren (Albelda und Buck, 1990; Hynes, 1992). Es werden dadurch Zell-zu-Zell- und Zell-zu-Substrat-Kontakte realisiert.

Hogan (1967) demonstrierte die schützende Funktion der ECM auf der Bruch'schen Lamina vor subretinalen Neovaskularisationsmembranen. Außerdem scheint die ECM eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie der proliferativen Vitreoretinopathie zu spielen (Campochiaro et al., 1986, Martini et al., 1992). Außerdem kommt der ECM eine wichtige Aufgabe zu bei Wundheilungsstörungen, wie sich aus ihrer vermehrten Produktion nach photogenen Verletzungen (Tso, 1973)

und bei der Abgrenzung von Tumoren (Wallow und Tso, 1972) schließen läßt.

Intermediärfilamente sind Bestandteile des Zytoskeletts der Säugetierzellen und dienen der Erhaltung und Organisation des Strukturgerüsts der Zelle. Es werden 5 Klassen unterschieden, die gewebespezifisch sind. Die Zytokeratine, die keratinähnliche Proteine enthalten, sind charakteristisch für Epithelien. Neurofilamente sind typisch für neuronale Zellen, Gliafilamente kommen in Gliazellen vor und Desminfilamente sind in Muskelfasern enthalten. Vimentin erscheint in verschiedenen mesenchymalen Zellen von Vertebraten (Franke et al., 1978, Schmid et al., 1979) und in einer Vielzahl kultivierter Zellen unabhängig von ihrem Gewebsursprung (Bennett et al., 1978; Franke et al., 1978; Hynes und Destree, 1978). Unter den Intermediärfilamenten präsentieren die Keratine die größte Untergruppe, die von Moll et al. (1982) katalogisiert wurde.

Als ein Epithel exprimiert das humane RPE Zytokeratine *in vivo* und *in vitro* (Hiscott et al., 1989). Zytokeratine dienen als typische epitheliale Zellmarker für das humane RPE in Kultur und können zur Bestimmung des Differenzierungsgrades herangezogen werden (Owaribe et al., 1988; Hunt und Davis 1990, McKechnie et al., 1991). Moll et al. (1982) zeigten, daß die Verteilung der Zytokeratine in den humanen RPE Zellen der Verteilung in anderen einfachen Epithelien ähnlich ist, erkennbar in einer Übereinstimmung in den Zytokeratinen 7,8,18 und 19 *in vitro*.

Turksen et al. (1989) konnten feststellen, daß fetale humane RPE Zellen sowohl Vimentin als auch Zytokeratin exprimieren, jedoch in unterschiedlichen Mengen. Diese Koexpression konnte auch für andere epitheliale Zelltypen von Lane et al. (1983) sowie La Rocca und Rheinwald (1984) nachgewiesen werden. Virtanen et al. beschrieben 1981 die Expression von Vimentin in Epithelzellen nur in phänotypisch veränderten Epithelzellen unter Kulturbedingungen.

1.5 RPE und Erkrankungen

Vererbare Formen retinaler Degenerationen und altersbedingter Veränderungen (z.B. altersbedingte Makuladegeneration (AMD), subretinale Neovaskularisation (SNV), Retinopathia Pigmentosa, Stargardt Erkrankung und Morbus Best), die eine Herabsetzung der Sehfunktion zur Folge haben, lassen sich häufig auf Veränderungen in der Struktur und Funktion des RPE zurückführen. Diese Tatsache räumt dem RPE eine zentrale Stellung bei der Erforschung dieser Krankheiten ein.

Bei den vererbaren Formen steht die Retinopathia Pigmentosa, bei den erworbenen Degenerationen die altersbedingte Makuladegeneration (AMD) im Vordergrund. Exemplarisch möchte ich die AMD herausgreifen. Diese ist in den westlichen Industrienationen die Hauptursache eines erheblichen Sehverlustes jenseits des 55. Lebensjahres. Die bisher veröffentlichten Studien zeigen eine Prävalenz von 8% in der Bevölkerung von Industriestaaten (Krott und Heimann, 1996). Bei Patienten über 65 Jahre steigt das Risiko auf etwa 17% an. Frauen sind aufgrund der demographischen Altersverteilung häufiger betroffen als Männer. Nach vorliegenden Studien ist die AMD eine der Hauptursachen für die anerkannte Blindheit in der zivilisierten Welt. Ferris et al. bezeichneten im Jahre 1984 die AMD als die häufigste Erblindungsursache in der Altersgruppe der 50-70 jährigen in den USA. Bei der AMD kommt es zu progressiven Veränderungen des RPE im Bereich der

Makula (Sarks und Sarks, 1989, Hogan 1972, Young 1987), die mit ihren ca. 50000 Zapfen die wichtigste Region am hinteren Augenpol darstellt. Die Veränderungen in der Makula gehen einher mit dem Nachweis von Drusen (Kliffen et al., 1994), der Dickenzunahme der Bruch'schen Membran (Green et al., 1985), der Akkumulation von Lipofuscin im RPE (Young, 1987) und Basalmembranablagerungen (Löffler et al., 1986). Es resultiert eine Abnahme der RPE Zellzahl. Die Ausbildung der AMD stellt ein multifaktorielles Geschehen dar, das in letzter Konsequenz noch nicht geklärt ist. Da die Behandlungsmöglichkeiten begrenzt sind, stellt diese Erkrankung ein zunehmend sozioökonomisches Problem dar.

1.6 Das humane Endothel der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cell-HUVEC)

Die innere Schicht aller Blut- und Lymphgefäße besteht aus vaskulären Endothelzellen. Diese Zellen bilden eine Barriere zwischen Körperflüssigkeiten und Gewebe. Sie sind verantwortlich für viele wichtige Funktionen, die Sekretion von Plasmakomponenten und die Bildung einer nicht-thrombotischen Oberfläche, die zirkulierende Zellen abwehrt. Das Aussehen der vaskulären Endothelzellen variiert je nach ihrem Ursprung. Die im Elektronenmikroskop sichtbare Ultrastruktur der Endothelzellen zeigt spezifische, in anderen Zellen nicht auftretende Organellen, die Weibel-Palade-Körper (Weibel und Palade, 1964; Lemeunier et al., 1969). Weibel-Palade-Körper sind membran-gebundene, stäbchenförmige Granulae, die parallele Anordnungen von 6-26 röhrenförmiger Strukturen enthalten (Gimbrone et al., 1974). In ihnen wird der von Willebrand-Faktor gespeichert (Wagner et al., 1982), der einen Marker von vaskuläre Endothelzellen darstellt. Immunhistochemisch sind vaskuläre Endothelzellen durch das Vorkommen des von Willebrand-Faktors, CD 31, Endoglin, Antithrombin III und Ulex europaeus-Lektin charakterisiert.

Zum Anlegen von Zellkulturen humaner vaskulärer Endothelzellen werden häufig Endothelzellen aus der Nabelschnurvene verwendet, da Nabelschnüre einfach zu beschaffen sind und Standardmethoden zur Isolierung und Langzeitkultivierung der Zellen vorliegen. Maruyama (1963) und Pomerat und Slick (1963) konnten Endothelzellen aus der Nabelschnur zuerst mit Erfolg isolieren. Allerdings gelang es erst Jaffe et al. (1973a), diese als vaskuläre Endothelzellen zu verifizieren. Optimiert werden konnten diese Methoden zur Isolierung und Kultivierung seither durch Thornton et al. (1983), Knedler und Ham (1987), Friedl et al. (1989) und Gorfien et al. (1993).

Bei den HUVEC handelt es sich um einen gut charakterisierten Zelltyp, der seine Morphologie und Charakteristiken in der Zellkultur kaum verliert. Daher wird diese Zelle zum Vergleich herangezogen.

1.7 Ziel der Arbeit

Das RPE spielt eine wichtige Rolle bei degenerativen Erkrankungen, deren häufigstes Erscheinungsbild die AMD darstellt. Aufgrund der veränderten Alterspyramide nehmen Inzidenz und Prävalenz dieser Erkrankung zu. Aus diesem Grunde wurde über neue Behandlungsmethoden nachgedacht, wie die RPE Transplantation. So begannen Forschergruppen vor ungefähr zehn Jahren der Frage nachzugehen, ob ein Ersatz durch gesunde RPE Zellen eine erfolgreiche Behandlung sein kann. Erste Untersuchungen fanden am Tiermodell durch Li und Turner (1990) sowie Gouras und Lopez (1990) statt. Die erste RPE Transplantation beim Menschen wurde 1991 von Peymann et al. durchgeführt. Dabei stellte sich weniger die operative Durchführung, sondern vielmehr die Gewinnung von funktionierenden, vitalen RPE Zellen in ausreichend hoher Zahl als Problem dar. Kultivierung von Spendermaterial zur Gewinnung genügend großer Mengen an Zellen bietet sich an, aber die Veränderung der Zellen *in vitro* muß berücksichtigt und minimiert werden.

Über die Eigenschaften von humanen adulten RPE Zellen in der Zellkultur ist bisher wenig bekannt und vergleichende Charakterisierungen zu anderen Zelltypen fehlen.

Eine immunhistochemische Charakterisierung dieser Zellen ist notwendig, um typische Eigenschaften *in vitro* als RPE spezifisch identifizieren und im Laufe der Passagierung beobachten zu können. Ziel der Arbeit ist die Definition von charakteristischen Zellmarkern und die Abgrenzung der Epithelzellen zu anderen Zelltypen. Dazu wurde als Vergleichszelllinie ein typisches vakuläres Endothel aus der Nabelschnurvene verwendet, welches Endothelcharakteristiken aufweist und zur Abgrenzung von epithelialen Strukturen im RPE dient. In der vorliegenden Studie sollte der ontogenetische Ursprung der RPE Zellen im Hinblick auf die Frage untersucht werden, ob es sich bei der RPE Zelle um ein reines Epithel handelt, oder ob diese Zelle auch Endothelcharakteristiken aufweist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien

Grundmedien für die Zellkultur

Ham's F12	-Gibco
Iscove's modifiziertes Dulbeccos Medium	-Gibco
Medium 199 mit Earle's Salzen	-Gibco

Supplemente und Biochemikalien

Amphotericin B	-Seromed (Biochrom KG)
Apo Transferrin	-Sigma
Betaisodona	-Mundipharma GmbH
bFGF	-Seromed
DMSO	-Sigma
Dulbeccos Phosphatpuffer ohne Kalzium und Magnesium	-Seromed (Biochrom KG)
ECGF	-Boehringer Mannheim
FCS	-Seromed
Gentamicin	-Gibco
Heparin	-Sigma
Insulin (vom Pankreas des Rindes)	-Sigma
Kollagenase IA	-Sigma
Kollagenase IV	-Sigma
NaCl-Lösung (0,9%)	-Pharmacia
Natriumhydrogenkarbonat	-Seromed (Biochrom KG)
NCS	-Sebak
Trypsin-EDTA (0,05% Trypsin in 0,02% EDTA)	-Gibco
Ulex europaeus Agglutinin, Typ I (UEA-1)	-Dako

Alle darüberhinaus verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

Zum Ansetzen sämtlicher Lösungen und pulverförmigen Medien wurde Wasser einer Millipore-Reinstwasser- Anlage verwendet.

Antikörper für immunhistochemische Färbungen

9.3.E. Ak gegen humane korneale Endothelzellen	-etabliert von PD. Dr. K. Engelmann
Anti Aktin Klon C 4	-Boehringer Mannheim
Anti Kanninchen Ig, AP konj.	-Sigma
Anti Kanninchen Ig, HRPO konj.	-Sigma
Anti Kanninchen IgG	-Sigma
Anti Maus Ig, AP konj.	-Boehringer Mannheim
Anti Maus Ig, FITC konj.	-Sigma
Anti Maus Ig, HRPO konj.	-Medac
Anti Maus IgG	-Sigma
Kanninchen-Anti Laminin, (polyklonal)	-Dako, Z0097
Kanninchen-Anti Antithrombin III (polyklonal)	-Dako, A0296
Kanninchen-Anti Neuron-spezifische Enolase (polykl.)	-Dako, N1516
Kanninchen-Anti Ulex europaeus Typ 1 (UEA-1), HRPO	-Dako, X0921
Kanninchen-Anti von Willebrand Faktor, (polyklonal)	-Dako, A0082
Kanninchen-Anti-Human Fibronectin, HRPO (polykl.)	-Dako, P0246
Maus-Anti CD31, Klon JC/70A	-Biogenex
Maus-Anti Cytokeratin 1, 5, 10, 14, Klon 34βE12	-Enzo
Maus-Anti Cytokeratin 18, Klon DC 10	-Dako
Maus-Anti Cytokeratin 19, Klon RCK 108	-Dako
Maus-Anti Cytokeratin 8, LWM, Klon 35βH11	-Dako
Maus-Anti Endoglin, CD105, Klon SN6h	-Dako
Maus-Anti Kollagen IV, Klon COL-94	-Sigma
Maus-Anti Laminin, Klon 4C7	-Dako
Maus-Anti Neuron-spezifische Enolase (NSE), Klon BBS/NC/VI-H14	-Dako
Maus-Anti Vimentin, Klon V9	-Dako

Produkte für Zellisolierung und Zellkultur

10- und 50 ml Zentrifugenröhrchen	-Nunc
50ml Perfusorspritzen	-B. Braun
6- und 12-Lochschalen	-Costar
Klonierungsplatten	-Greiner Labortechnik
Kryoröhrchen, 2ml	-Costar
Latex- Handschuhe (OP)	-Hartmann
Metalladapter, d=4mm, d=1,5mm	-Geuder

Petrischalen (20cm Durchmesser)	-Schott
Pinzette	-Geuder bzw. Storz
Skalpell, Cutfix	-B. Braun Melsungen AG
Steriles Nahtmaterial, 3,0	-Ethicon
Verschlußkonus	-Braun
Zellkulturflaschen, 25cm ²	-Costar
Zellschaber ,23cm	-Nunc

Zellen

HUVEC	-Humane vaskuläre Endothelzellen der Nabelschnurvene
RPE	-Humane Retinale Pigmentepithelzellen

Materialien für die Anfärbung von Gewebeschnitten

Aquatex	-Merck
Citratpuffer, 10mM, pH=6	-Biogenex
Deckgläschen 24x32 mm	-Marienfeld
EDTA (100mmol)	-Fluka-AG
Formaldehydlösung mind. 37% + säurefrei,	-Merck
LSAB-2 Kit, Alkalische Phosphatase	-Dako
Mayers Hämatoxylin	-Merck
Objektträger Superfrost plus	-Menzel Gläser
Proteinase K , 20µ/ml	-Boehringer Mannheim
Tris-Puffer, pH 7,4—8	-Merck
Verdünnungsflüssigkeit für 1. Ak, 50ml,	
Antibody diluent with background reducing components	-Dako
Xylol-Eu-Kitt	-O-Kindler GmbH & Co

Materialien für die SDS-PAGE Elektrophorese

Polyacrylamidgele, Gradient 10-15%	-Pharmacia LKB
SDS Puffer Streifen (buffer strips)	-Pharmacia LKB
Kämme, 8/1	-Pharmacia LKB
Membranfilter	-Schleicher und Schuell
Rainbow Marker	-Amersham Life Science
LWM (Low weight marker)	-Amersham Life science
Fibronektin	-Sigma
Laminin	-Gibco
Kollagen IV	-Sigma

Geräteliste

Brutschrank Cytoperm	-Heraeus
Doppel Strahl Spectralphotometer	-Shimadzu
Einbettautomat	-Shandon Citadel 2000
Gefrierautomat	-Cryosom
Gel-Elektropheresevorrichtung mit Elektrotransfereinheit	-Pharmacia LKB
Homogenisator	-Braun Melsungen
Fotomikroskop MPS 51S	-Leitz Fluovert Wild
Minizentrifuge Centrifuge 5415	-Eppendorf
Omnifuge, 2,0 RS	-Heraeus
Reprovit	-Leitz Wetzlar
Rotationsmikrotom	-Leitz Wetzlar
Stickstofftank	-Cryosom
Ventana ES	-Ventana Medical System

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung und Kultivierung von RPE Zellen

Medien

Für die Isolierung und Kultivierung von retinalem Pigmentepithel wurden 3 Medien (Präparations-, Wachstums- und Kulturmedium) verwendet. Die Grundlage aller Medien bildete das Medium F99, eine 1:1 Mischung aus Ham's F12 und M199, pH 7,35. Das Präparationsmedium beinhaltete zusätzlich 1% FCS. Das Wachstumsmedium für die Primärkultur wurde mit folgenden Supplementen ergänzt:

- 10% FCS
- 1 µg/ml Insulin
- 2,5 µg/ml Amphotericin B
- 10 mg/ml Gentamycin
- 15% Uvea-konditioniertes Medium (siehe unten)

Ab der 1. Passage bestand das Kulturmedium aus F99, supplementiert mit 5% FCS und 1mg/ml Gentamycin.

Vor jeder Verwendung wurden die Medien in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Die Zellkulturschalen wurden mit 0,1%iger Gelatine beschichtet und anschließend 2 mal mit PBS gewaschen.

Präparation des Bulbus

Die Präparation der RPE Zellen erfolgte von Spenderaugen Verstorbener, die nach der Einwilligung zur Hornhautspende im Institut der Rechtsmedizin entnommen wurden.

Nach der Entnahme des Bulbus wurde der vordere Augenabschnitt an der Spaltlampe befundet. Danach wurde das Auge mit 4%iger PVP Jod-Lösung für 4 Minuten desinfiziert und mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült. Der Bulbus wurde auf einem Saugnapf nach Spitznas (1974) gelagert und die Hornhaut samt eines Skleraringes mit einem 15mm Handtrepan trepaniert. Die Korneoskleralscheibe wurde entnommen, in Kulturmedium überführt und nach der Befundung des Hornhautendothels wurde die Hornhaut bei 37°C mit 5% CO₂ Begasung im Brutschrank organ-konserviert (Böhnke et al., 1991).

Präparation der Uvea (Chorioidea und RPE)

Die Sklera des Restbulbus wurde im Bereich der Ora serrata zirkulär umschnitten und anschließend die Linse, der Ziliarkörper und der Glaskörper entfernt. Der verbliebene Bulbus wurde halbiert, wobei der Nervus Opticus als Struktur nicht durchtrennt wurde. Vorsichtig wurde nun die

Netzhaut mit Schere und Pinzette an der Austrittsstelle des Sehnerven abgetrennt. Die darunter befindliche Chorioidea mit dem RPE wurde abpräpariert und pro Auge in 2 ml PBS überführt.

Enzymatische Isolierung der Retinalen Pigmentepithelzellen

Kollagenase ist eine neutrale Protease, die Kollagen, eine Hauptkomponente des extrazellulären Bindegewebes, zu spalten vermag. Es wird vor allem in der Gewebe- und Zellkultur zur Gewinnung von Primärkulturen angewandt, allerdings auch zur schonenden Subkultivierung besonders empfindlicher Zellen.

Die Konzentration der Kollagenase zur Dissoziation des RPE Monolayers aus dem Gewebeverband betrug 0.5 mg/ml, und bestand aus einer 1:1 Mischung aus Kollagen 1A und IV (jeweils 0,5 mg/ml).

Nach einmaligem Waschen der Uvea in PBS wurde diese in 2 ml der Kollagenaselösung aufgefangen, vorsichtig darin ausgebreitet und für 12-16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Uvea kräftig in der Kollagenase geschwenkt, um die RPE Zellen von der Chorioidea abzulösen (Methode nach Sobottka Ventura, 1996).

Die nach der Ablösung im Kollagenasegemisch verbliebenen RPE Zellen -und Erythrozytensuspension wurde in 1 ml Präparationsmedium (siehe oben) aufgenommen und bei 100 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 4ml Wachstumsmedium (siehe oben) pro Bulbus resuspendiert.

Die insgesamt 8ml beinhaltende Zellsuspensionslösung wurde auf 4 Löcher einer 24-Lochschale ausgesät.

Nach 24 Stunden erfolgte ein kräftiges Spülen, um verklumpte Zellen und Zelldetritus von den bereits adhären Zellen abzulösen. Die abgelösten Zellen wurden aufgenommen und in 4 weitere vorbehandelte Löcher gegeben. Die Ursprungsaussaat wurde mit Wachstumsmedium aufgefüllt. Im Anschluß wurde das Zellkulturmedium alle zwei Tage erneuert. Nach etwa 7 Tagen konnten konfluent gewachsene RPE Zellen aus einem 24-er Loch auf ein Loch einer 12-Lochschale umgesetzt werden. Weitere Umsetzungen erfolgten in einem Verhältnis von 1:4.

Herstellung von Uvea-konditioniertem Medium

Die Reste der Uvea wurden entfernt und in eine 24-Lochschale mit dem Grundmedium F99 plus 1% FCS gegeben. Maximal 3 Wochen wurde die Uvea mit diesem Mediengemisch inkubiert, wobei alle 4 Tage das Medium gewechselt wurde. Die dabei gewonnenen Mediumüberstände wurden in Zentrifugenröhrchen aufgefangen und bei 4°C gelagert, um sie als sogenannten konditionierten Mediumzusatz für die Primärkultur zu verwenden. Bevor sie dem RPE-Kulturmedium zugefügt wurden, erfolgte eine Sterilfiltration.

Passagieren von RPE

Die am häufigsten gebräuchliche Methode, adhärenente Zellen zu subkultivieren beruht auf der Anwendung des Enzyms Trypsin (0,05% Trypsin in 0,02% EDTA-Lösung). Diese Methode wurde auch für die Passagierung der RPE Zellen verwendet.

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 3-5 Minuten inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02% in kalzium-, magnesiumhaltigem PBS) auf die Zellen, wobei der EDTA Zusatz zur Komplexbildung der freien Kalzium- und Magnesiumionen diente.

Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und war erkennbar an den sich abrundenden Zellen. Nach ca. 4-5 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gespült und die Zellsuspension in ein mit 5ml Kulturmedium gefülltes Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Dabei war darauf zu achten, daß die Zellen nicht zu lange mit der Trypsin/EDTA-Lösung in Kontakt blieben, da längere Einwirkzeiten die Lebensfähigkeit der Zellen irreversibel schädigten. Das im Kulturmedium enthaltene Serum (FCS, 5%ig) bewirkte eine sofortige Inaktivierung des Trypsins und eine Komplexbildung des überschüssigen zytotoxischen EDTA.

Die Zellsuspension wurde bei 100 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und das Pellet mit Kulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellen im Verhältnis 1:4 in die vorbereiteten Kulturschalen umgesetzt.

Kryokonservierung der RPE Zellen

In der vorliegenden Methode wurde eine DMSO-Konzentration von 10% verwendet. Die DMSO-Lösung bestand zu 80 % aus dem Medium F99, zu 10 % aus FCS und weiteren 10 % aus DMSO. Die Vorbereitung der Zellen erfolgte in einmaligem Spülen mit PBS, dem oben beschriebenen Abtrypsinieren und dem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 100 g. Der Überstand wurde abgesaugt. Die Zellsuspension wurde in 1,5ml DMSO-Lösung aufgenommen und in Kryoröhrchen gefüllt. Unter Anwendung des Leukozyteneinfrierprogramms wurden die RPE Zellen schrittweise auf -120°C gekühlt und danach in einen Stickstofftank zur Langzeitaufbewahrung überführt. Dieses Verfahren ermöglichte eine fortwährende Bereitstellung von Zellen für die Experimente.

Auftauen der RPE Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zellsuspension wurde aus dem Kryoröhrchen in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde mit 6ml Kulturmedium (F99+5% FCS, 1mg/ml Gentamicin) aufgefüllt und bei 100g für einen Zeitraum von 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 37°C vorgewärmten Kulturmedium resuspendiert und auf einer entsprechend vorbereiteten und beschichteten Kulturplatte ausgesät.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen vaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Für Untersuchungen mit humanen Endothelzellen wurden Endothelzellen der Nabelschnurvene isoliert. Die Nabelschnüre stammten von gesunden Neugeborenen, deren Geschlecht nicht bekannt war. Die Nabelschnüre wurden uns freundlicherweise durch Mitarbeiter der gynäkologischen Klinik der Universitätsklinik Hamburg zur Verfügung gestellt .

Nach der Methode von Friedl et al. (1989) wurden insgesamt 6 Nabelschnüre aufgearbeitet, wobei in 4 Fällen HUVEC erfolgreich isoliert werden konnten. Diese Kulturen bildeten nach 2-3 Tagen einen konfluenten Zellrasen aus. Bei diesen 4 Nabelschnüren erfolgte die Zellisolierung 10-15 Stunden nach Geburt, während bei den beiden anderen Nabelschnüren diese 28 bzw 32 Stunden post partum erfolgte.

Materialien

Alle Geräte und Materialien wurden steril verwendet.

250ml-Glasflaschen

Latex-Handschuhe

2 Metalladapter

Nahtmaterial, 3,0 (Seide)

50ml-Perfusorspritzen

Petri-Schalen (20cm Durchmesser)

Pinzetten

Skalpell“Cutfix“

Verschlußkonus

Zellkulturflaschen, 25cm²

10ml-Zentrifugenröhrchen

Zur Präparation von HUVEC verwendete Medien

1. Transportmedium

Als Transportmedium für die Nabelschnüre wurde eine sterile PBS-Lösung mit 1mg/ml Gentamycin verwendet. Für den Transport vom Kreissaal der Frauenklinik zum Hornhautlabor befand sich die Lösung in einer sterilen 250ml Glasflasche und wurde bis zum Transport bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2. Präparationsmedium

Zum Präparieren der HUVEC wurde eine 1:1 Mischung aus Iscove's DME und Ham's 12 benutzt. Dieses als IF bezeichnete Medium wurde mit 10% NCS supplementiert.

3. Kulturmedium

Für die Kultivierung der Zellen wurde dem oben genannten IF Medium folgende Zusätze beigegeben:

- 15 % NCS
- 5 µg/ml Heparin
- 10 ng/ml bFGF
- 0.5 mg/ml ECGF
- 5 µg/ml Transferrin
- 1 mg/ml Gentamycin

Gewebebehandlung

Die möglichst steril entnommene Nabelschnur wurde in die mit Transportmedium gefüllte Flasche eingebracht. Dabei war folgendes zu beachten:

- Länge der Nabelschnur (20- 30 cm)
- Befreiung der Nabelschnurvene von Blutresten
- Notieren von Uhrzeit und Datum der Geburt

Eine Lagerung von 4°C wurde empfohlen, um eine eventuelle bakterielle Kontamination zu verringern.

Zellisolierung von HUVEC

Die Nabelschnur wurde mit einer sterilen Pinzette aus dem Transportmedium entnommen und in eine Petri-Schale gelegt. Ein Gewebestück von ca. 2 cm Länge wurde von beiden Seiten mit dem Skalpel abgetrennt. Die Vene wurde an einem Ende mit einem Metalladapter kanuliert und mit Nahtmaterial mittels eines gegenläufigen Doppelknotens extern fixiert. An die befestigte Seite wurde eine mit 50 ml PBS gefüllte Perfusorspritze angesetzt. Durch Spülen mit PBS wurde das Innere der Vene gereinigt. Nach der darauffolgenden Kanulierung des zweiten Venenendes wurde an einem Ende eine mit 20 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02 % EDTA) gefüllte Spritze befestigt und die Nabelschnur mit der Enzymlösung gefüllt.

Anschließend wurden beide Enden der Nabelschnur mit Verschlusskoni an den Metalladaptern verschlossen und diese in eine zweite Petri-Schale gelegt, mit vorgewärmter PBS-Lösung bedeckt und für 25 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Bereits vor der Zellisolierung wurden 3 Zellkulturflaschen (25cm²) mit 0,1%iger Gelatine beschichtet und bei Raumtemperatur stehengelassen. Vor der Aussaat der Endothelzellen erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellkulturflaschen mit PBS.

Die in der Enzymlösung befindlichen Endothelzellen wurden nach der Inkubation mit einer leeren 20 ml Spritze aufgezogen und die Lösung in ein mit 5ml NCS gefülltes 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben.

Auf beiden Seiten wurden, anstelle der Verschlußkoni, Perfusorspritzen aufgesetzt. Eine enthielt Präparationsmedium, die andere war ungefüllt. Die Flüssigkeit wurde mehrfach durch die Vene hin und her gespült und dann in ein weiteres, NCS (10%ig) enthaltendes Zentrifugenröhrchen, überführt. Der Vorgang wurde noch einmal mit frischem Medium wiederholt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde die Nabelschnur vor dem letzten Schwenkgang leicht massiert. Die drei Zellsuspensionen wurden bei 100 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in je 5 ml Kulturmedium aufgenommen und auf die vorbereiteten Kulturflaschen ausgesät. Nach 3-24 Stunden erfolgte nochmals ein Kulturmedienwechsel.

Subkultivierung der HUVEC

Das Passagieren der HUVEC fand in gleicher Weise statt wie bei den RPE Zellen. Zur enzymatischen Dissoziation des Monolayers wurde ebenfalls eine Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA) verwendet. Die Beschichtung der Zellkulturflaschen erfolgte mit 0,1%iger Gelatine-Lösung. Das Umsetzen der Zellen erfolgte alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:4.

Das Kulturmedium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

Kryokonservierung und Auftauen der HUVEC

Die Langzeitkonservierung von HUVEC diente dem Ziel, immunhistochemische Färbungen mit einer Zellkultur reproduzieren zu können. Dabei wurde dasselbe Verfahren angewendet, wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

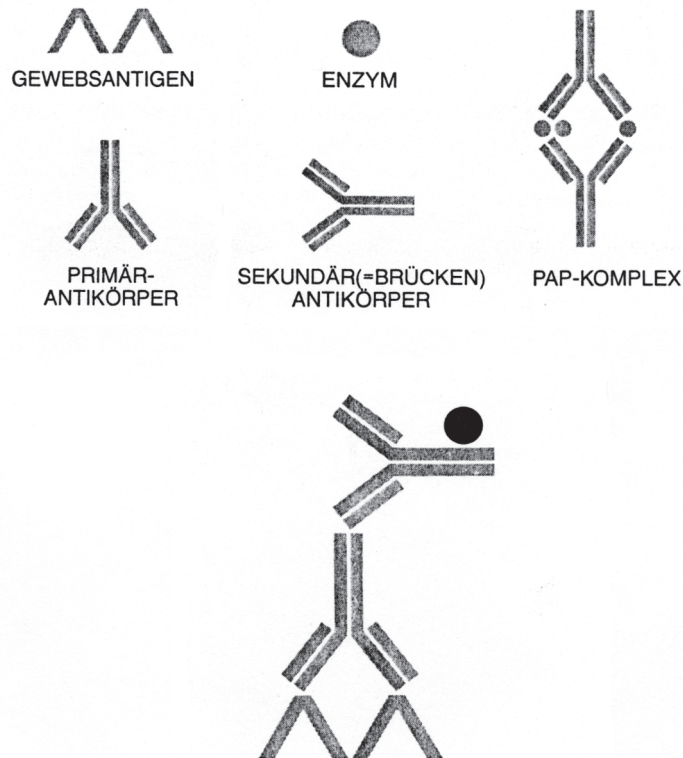
2.2.3 Immunhistochemische Färbungen

Als Grundlage der Färbungen diente eine indirekte Methode, bei der es zur Bindung eines unkonjugierten Primärantikörper an das Antigen kommt. Um diese Anlagerung zu lokalisieren, wurde ein alkalische Phosphatase- konjugierter Antikörper verwendet, der an den Primärantikörper bindet, und als Brücken- oder Sekundärantikörper bezeichnet wird. Dieser ist gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet.

Stammte der Primärantikörper aus der Maus, so wurde ein gegen Maus-Immunglobuline gerichteter Sekundärantikörper verwendet.

Als Enzymmarkierung des Brückenantikörpers wurde die alkalische Phosphatase eingesetzt, welche aus dem Darm von Kälbern gewonnen wurde und ein Molekulargewicht von 100 kD besaß. Sie bewirkte eine Durchtrennung von Phosphat-Sauerstoff- Bindungen organischer Ester in der Farbsubstratlösung und wandelte so die farblosen Substratmoleküle in gefärbte Endprodukte um. Die folgende Skizze, entnommen aus dem Handbuch I immunhistochemischer Färbemethoden (Dako) S.22, zeigt schematisch den Mechanismus der indirekten 2-Schritt-Methode.

ERLÄUTERUNG



Konfluente RPE und HUVEC-Zellen, früher Passagen wurden für die immunhistochemischen Färbungen auf Klonierungsplatten kultiviert.

Der erste Arbeitsschritt bestand in einem dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS.

Die Zellkulturen wurden anschließend mit Glycin Puffer (70% Ethanol in 50mM Glycin Lösung, pH 2) für 10 Minuten bei -18°C fixiert. Die weiteren Waschschriffe erfolgten mit einem Waschpuffer, der aus PBS und 1% FCS bestand.

Danach wurden die monoklonalen bzw polyklonalen Antikörper in der angegebenen Verdünnung aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Wiederum wurde dreimal mit dem Waschpuffer gewaschen, bevor der mit alkalischer Phosphatase markierte Brückenantikörper in der entsprechenden Verdünnung auf die Zellen gegeben wurde. Die anschließende Inkubation betrug 20 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschriffe wurden die Zellen mit Tris-HCl Puffer (50mMol, pH 9,5) für 5 Minuten inkubiert.

Die abschließend zugegebene Substratlösung bestand aus $13\mu\text{l}$ NBT (nitroblue tetrazolium, 75 mg/ml in 70%igem Dimethylformamid und $10\mu\text{l}$ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat als Toluidinium Salz (50mg/ml in 100%igem Dimethylformamid), die mit 3 ml Tris-Puffer frisch angesetzt wurden. Nach dem Auftragen wurde unter dem Lichtmikroskop die auftretende Färbung beobachtet. Die Reaktion wurde mit PBS-Spülungen gestoppt.

Bei den verwendeten Primärantikörpern, die mit Horseradish-Peroxidase (HRPO) konjugiert waren, fiel die zweite Inkubation mit dem Brückenantikörper weg. Anstelle des 50mM Tris-Puffers pH 9,5 wurde nach den Waschschriffen ein Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7,35 verwendet. Der

zuletzt benötigte Entwickler war lichtempfindlich und wurde aus diesem Grunde kurz vor Zugabe angesetzt. Zunächst wurden 3 mg 4-Chlor-1-naphthol, in 1 ml Methanol gelöst und anschließend mit 5ml Tris-Puffer und 20µl Wasserstoffperoxid (30%ig) aufgefüllt. Die Färbereaktion wurde durch Waschen mit PBS gestoppt.

Die beschriebene Methode wird als Immunperoxidase-Verfahren bezeichnet.

Der Nachweis der Bindung des Antikörpers 9.3.E erfolgte mittels Immunfluoreszenz. Der interspezies-spezifische Antikörper (Maus/Ziege) GAM (goat-anti-mouse) war mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC gekoppelt. Nach der Inkubation konnte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leitz Fluovert Wild) die Fluoreszenz beobachtet werden.

Beim Nachweis des spezifischen Endothelmarkers Ulex europaeus wurde den Zellen zuvor Ulex europaeus Agglutinin, Typ I (UEA-1), aus dem Stechginster, in einer Verdünnung von 1:100 zugesetzt, um anschließend nach dem Immunperoxidase Verfahren zu färben.

Es wurden folgende kommerziellen Antikörper verwendet:

Antikörper gegen Komponenten der extrazellulären Matrix:

Name	Quelle	Art	Färbung mit gekoppelten Sekundär- antikörper	Verdünnung
Human Laminin	Maus	Klon 4C7	AP	1:25
Human Laminin	Kaninchen	Polyklonal	AP	1:30
Human Kollagen IV	Maus	Klon COL-94	AP	1:100
Human Fibronectin	Kaninchen	Polyklonal	HRPO	1:100

Antikörper gegen zellassozierte Proteine:

vWF	Kaninchen	Polyklonal	AP	1:100
CD 31	Maus	Klon JC/70A	AP	1:100
Endoglin, (CD 105)	Maus	Klon SN6h	AP	1:10
Ulex-Europaeus- Lektin	Kaninchen	Polyklonal	HRPO	1:50
Antithrombin III	Kaninchen	Polyklonal	AP	1:100

Antikörper gegen intermediäre Filamente:

Cytokeratine

1, 5,10, 14	Maus	Klon 34βE12	AP	1:100
Cytokeratin 8, LWM	Maus	Klon 35BH11	AP	1:25
Cytokeratin 18	Maus	Klon DC10	AP	1:20
Cytokeratin 19	Maus	Klon RCK108	AP	1:100
Vimentin	Maus	Klon V9	AP	1:25

Antikörper gegen neuroektodermale/neuroendokrine Marker:

NSE (Neuronen spezifische Enolase)	Kaninchen	Polyklonal	AP	1:1
NSE	Maus	Klon BBS/ NC/VI-H14	AP	1:10

Als Positivkontrolle wurde verwendet:

Anti-Aktin	Maus	KlonC4	AP	1:100
------------	------	--------	----	-------

Als Negativkontrolle wurden eingesetzt:

Maus Ig	Maus			1:100
Kaninchen IgG	Kaninchen			1:1000

Antikörper 9.3.E:

9.3.E	Maus	Monoklonal	FITC	1:10
-------	------	------------	------	------

Beim Nachweis der Matrixproteine Laminin, Kollagen IV und Fibronectin wurde in einem vorangehenden Waschschriff eine Ammoniumhydroxid-Lösung (20mM) verwendet, die eine Lysierung der Zellen bewirkte, um zelluläre Matrix für die Antikörperfärbung freizulegen. Unter dem Fotomikroskop wurde zunächst ein Abrunden, dann ein Platzen der Zellen beobachtet, die in einem abschließenden Schriff abgespült wurden. Somit entfiel, bei der Anwendung dieser Lösung, der Vorgang der Zellfixierung.

2.2.4 Färbungen von Gewebeschnitten

Spendermaterial

Zur Herstellung der Paraffinschnitte standen folgende Gewebeproben zur Verfügung:

humaner Bulbus (Rechtsmedizinisches Institut, Universitätsklinik Hamburg, Prof. Dr. Püschel),
humane Nabelschnur (Gynäkologische Universitätsklinik Hamburg, Prof. Dr. Jänicke)

Materialien für die Anfertigung und Färbung der Gewebeschnitte

Folgende Biochemikalien und Geräte wurden verwendet:

Aquatex
Formalin, 10%ig, neutralgepuffert, pH 7,0-7,6
Einbettautomat
EDTA-Lösung (100mM)
Rotationsmikrotom
Tris-Puffer, (5mM), pH 7,4-8
PBS, pH 7,2-7,6
Citratpuffer, (10mM), pH 6,0
Proteinase K (20µg/ml)
Verdünnungsflüssigkeit für 1. Antikörper
LSAB-2 Kit, alkalische Phosphatase
Mayer's Hämatoxylin
Ventana ES
Deckgläschen, 24 -32 mm
Objektträger Superfrost Plus
Xylol-Eu-Kit

Gewebefixierung und -bearbeitung

Die zu untersuchenden Gewebe wurden zur Fixierung in neutralgepuffertes 10%iges Formalin gelegt. Die Fixierdauer war abhängig von der Größe des Gewebestückes. So verblieb die Nabelschnur für einen Tag, der Bulbus für 3 Tage in der Formalinlösung. Nach dem Fixieren wurden die temporal und nasal befindlichen Kalotten des Augapfels abgetrennt, und von der Nabelschnur nur ein Gewebstück von ca. 1 cm Länge verwendet.

Innerhalb von 12 Stunden wurden die Gewebeschnitte in den Einbettungsautomaten eingebracht,

wo sie in aufsteigender Ethanolreihe, Konzentrationen von 80% über 96% bis 100% sowie Trichlormethan dehydriert, geklärt und mit flüssigem Paraffin (60°C) eingebettet wurden. Die Gewebestücke wurden mit flüssigem Paraffin zu Blöcken in einer Größe von 1cm x 1cm x 0,5cm gegossen.

Am Rotationsmikrotom wurden 4µm dicke Paraffinschnitte angefertigt, die mindestens 1 Stunde bei 60°C getrocknet wurden.

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Histologischen Labors der Augenuniversitätsklinik Hamburg.

Gewebevorbereitung für die Färbung

Zur vollständigen Entfernung des Einbettmediums wurden die Schnitte in einem ersten Xylolbad gespült und in einem zweiten für 20 - 30 Minuten entparaffiniert.

Der Vorgang des Rehydrierens umfaßte eine Spülung und darauffolgende Inkubationen von jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Ethanolkonzentrationsreihe. Begonnen wurde mit absolutem Ethanol, dann 96%igem und 80%igen Ethanol. Ein abschließendes 5 minütiges Bad in Aqua dest. beendete die Vorbereitung.

Vorbehandlung

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 Citratpuffer oder Proteinase K vorbehandelt. Vor Gebrauch wurde der Citratpuffer (10mM) in der Mikrowelle erhitzt. Der entparaffinierte Gewebeschnitt wurde mit diesem erhitzten Citratpuffer 15 Minuten inkubiert. Die Proteinase K wurde mit Tris-Puffer angesetzt (2mg auf 100ml), und zur enzymatischen Behandlung der Gewebeschnitte für 30 Minuten bei 37°C aufgebracht.

Der Tris-Puffer hatte folgende Zusammensetzung :

6,1 g Tris

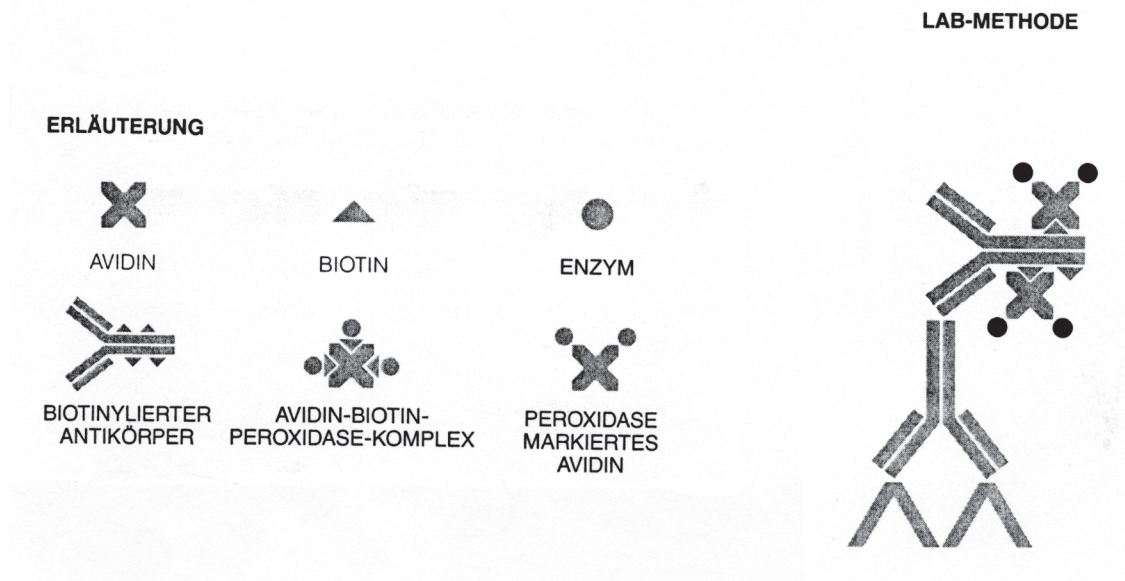
8,8 g NaCl

37 ml 1M HCl mit H₂O auf 1 Liter.

Färbung nach der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB)

Diese Technik basierte auf der „Labelled Streptavidin Biotin“-Methode nach Hsu et al., (1981). Dabei wird die starke Affinität von Streptavidin für Biotin (Dissoziationskonstante 10⁻¹⁹) ausgenutzt. Voraussetzung ist ein biotinylierter Zweitantikörper. Das mit der alkalischen Phosphatase-markierte Streptavidin bindet an das Biotin des zweiten Antikörpers.

In der nachfolgenden Zeichnung aus dem Handbuch II immunhistochemischer Färbemethoden (Dako), S.25 ist der Mechanismus dargestellt.



Färbungen mit dem LSAB2-Kit nach Dako

Nach der enzymatischen Vorbehandlung der fixierten Gewebeschnitte wurden zunächst alle Schnitte in einer PBS-Lösung gespült. Nach einem vorsichtigen Abtupfen der Pufferlösung vom Objektträger wurden die Schnitte mit den zu untersuchenden Primärantikörpern für 10 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Dem schloß sich ein dreimaliger, jeweils 5 minütiger Waschgang mit PBS-Lösung an. Danach wurde der biotinylierte Brückenantikörper für 10 Minuten hinzugegeben. Nach drei erneuten PBS-Spülungen wurde mit alkalische Phosphatase-gekoppeltem Streptavidin für 10 Minuten inkubiert. Auch hiernach wurde dreimal mit PBS gewaschen. Die Substrat-Chromogenlösung wurde kurz vor dem Auftragen frisch zubereit. Die Substratlösung bestand aus 1:20 verdünntem Trispufferkonzentrat (0,05 M, pH 7,2-7,6) und aus 1:40 verdünntem Substratpuffer. Die Chromogenlösung wurde in einem separaten Gefäß unter dem Abzug mit dem Aktivierungsreagenz im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach 2 Minuten wurde die zuvor angesetzte Substratlösung im Verhältnis 1:20 mit der Chromogenlösung vermischt und für 5 Minuten auf den Objektträger inkubiert. Danach wurde mit Aqua dest. einmal kurz gespült und mit Mayer's Hämatoxylin für 45 Sekunden gegengefärbt. Den Abschluß bildeten zwei Spülungen mit Aqua dest. und ein 5 minütiges Bad mit Leitungswasser. Zum Eindecken wurde Aquatex verwendet. Alle Kitreagentien wurden vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht. Beim Ablauf der Färbung mußte darauf geachtet werden, daß die Gewebeschnitte nicht eintrocknen.

Vollautomatische immunhistochemische Färbung mit dem Gerät Ventana

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Schäfer vom histologischen Labor des pathologischen Institutes im UKE wurden vollautomatische Färbungen mit dem Ventana-Gerät an Gewebeschnitten der Nabelschnur und des Bulbus nach der Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode angefertigt. Als Enzym wurde wieder die alkalische Phosphatase eingesetzt.

Die dafür benötigten Schnitte wurden auf zwei Arten einer Vorbehandlung unterzogen. Die enzymatische Vorbehandlung mit der Protease wurde automatisch im Gerät Ventana durchgeführt. Es erfolgte eine Vorbehandlung mit EDTA.

Die gesamte Färbeprozedur fand im Gerät Ventana statt. Die Primärantikörper wurden für 32 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Sekundärantikörper verblieb 4 Minuten auf den Gewebeschnitten. Als Detektionssystem fand das Farbsubstrat Fast red, anstelle von Neufuchsin Anwendung. Da das Farbsubstrat Fast red alkoholbeständig ist, wurde als Eindeckmedium Xolol-Eu-Kitt (O-Kindler GmbH) verwendet.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper, die Art der Vorbehandlung, die Quelle und die eingesetzte Verdünnung.

Antikörper gegen:	Vorbehandlung	Dauer	Quelle	Verdünnung
Laminin	Citratpuffer	15	Kaninchen	1:50
Kollagen IV	Proteinase K	30	Maus	1:50
Endoglin	Proteinase K	4	Maus	1:5
	EDTA	20	Maus	1:5
CD31	Protease	8	Maus	1:1
	Protease	16	Maus	1:1
Faktor VIII	Protease	8	Kaninchen	1:500
				1:1000
				1:2000
Cytokeratin 8	Proteinase K	30	Maus	1:50
Cytokeratin18	Citratpuffer	15	Maus	1:10
Vimentin	Protease	8	Maus	1:1
	Protease	16	Maus	1:1
NSE (Monoklonal)	EDTA	20	Maus	1:50
	Protease	8	Maus	1:50

Protease (im Gerät Ventana enthalten, erfolgt automatisch)

Positivkontrolle

Aktin	Proteinase K		Maus	1:100
-------	--------------	--	------	-------

Negativkontrollen

Maus IgG	—	Maus	1:100
Kaninchen IgG	Proteinase K	Kaninchen	1:1000

2.2.5 Herstellung von Zellextrakten und Proteinbestimmung nach Lowry, Bradford bzw Smith

Herstellung von Zellextrakten

Für die Isolierung der Zellproteine wurde ein Proteinextraktionspuffer mit folgender Zusammensetzung verwendet:

0,25M Tris, 4% Natriumdodecylsulfat (SDS), 40% Glycerol, 4% β -Mercaptoethanol, pH 6.8

Der Puffer wurde mit einem Tropfen Bromphenolblau gefärbt und bei -20°C gelagert.

Für die Herstellung der Zellextrakte wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Im Anschluß daran wurden 100 μl Proteinpuffer auf die Kulturfläche gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Lösung wurde in ein Kryoröhrchen aufgenommen und bei -18°C aufbewahrt.

Vor der Verwendung wurden alle Extrakte auf Eis in einem Potter homogenisiert und danach die Proteinkonzentration nach folgenden Verfahren bestimmt.

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) durchgeführt und beinhaltet eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure. Sie basiert auf der Reduktion des Folin-Reagenzes durch aromatische Aminosäuren.

Es wurden folgende Lösungen verwendet:

Lösung 1: 10g Na_2CO_3 und 0,25g K-Na-Tatrat in 500ml Wasser

Lösung 2: 50mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 50ml Wasser

Lösung 3: Mischung aus neun Teilen Lösung 1 und einem Teil Lösung 2

Lösung 4: Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung 1:1 mit Wasser verdünnt

Lösung 5: 50%ige Trichloressigsäure in Wasser

Lösung 6: 5%ige Trichloressigsäure in Wasser

Lösung 7: 1 N NaOH in Wasser

Die Lösung 3 wurde jeweils kurz vor Verwendung frisch hergestellt.

Es wurden von 12 HUVEC- und 19 RPE Zellkulturen Extrakte verwendet. Jeweils 20 μl dieser Extrakte wurden mit Wasser auf 1ml aufgefüllt.

Rinderserumalbumin (BSA) diente zur Erstellung einer Standardreihe.

Die Proteinfällung mit Trichloressigsäure erfolgte bei 4°C . Die Proteinlösungen wurden auf 1ml aufgefüllt, nach Zugabe von 0,1 ml 50%iger Trichloressigsäure 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend 20 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Heraeus, Omnifuge RS 2,0). Der Überstand

wurde dekantiert und das Sediment in 1ml 5%iger Trichloressigsäure aufgenommen. Danach schloß sich eine weitere Zentrifugation bei 3000 g an. Die weitere Behandlung der Proben erfolgte bei Raumtemperatur. Das Sediment wurde in 0,4ml 1 N NaOH aufgenommen und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde pro Ansatz 0,3ml Wasser und 3ml der Lösung 3 zugegeben. Diese wurden für 10 Minuten stehengelassen, worauf die Zugabe von 0,3ml Folin-Ciocalteus-Phenol-Lösung erfolgte. Nach der letzten Einwirkzeit von 30 Minuten wurde die Extinktion der Probe bei 750 nm gemessen. Mit Hilfe der Proteinstandards wurde eine Eichgerade erstellt und die Proteinkonzentration der Zellextrakte bestimmt. Eine Proteinkonzentration von 100µg führte zu einer Extinktion von 0,44.

Proteinbestimmung nach Bradford

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde von Bradford (1976) etabliert.

Das Farbreagenz bestand aus:

100mg Coomassie Brilliant Blue G 250

50ml 95%iges Ethanol

100ml 85%ige Phosphorsäure (w/v)

mit Wasser auf 1 Liter aufgefüllt

Das Reagenz konnte mehrere Wochen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

Zu 1ml Farbreagenz wurde 0,1ml Probe (Proteingehalt max. 10µg) gegeben und für 5 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 595nm gemessen und der Proteingehalt anhand einer Eichgerade mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 2 bis 10µg ermittelt.

Proteinbestimmung nach Smith

Die von Smith et al. (1985) entwickelte Methode basiert auf der Biuret-Reaktion und benutzt als Reagens BCA (bicinchoninic acid).

Reagenz A:

1,0 % BCA-Na

2,0 % Na₂CO₃ x H₂O

0,16% Na₂-Tatrat

0,4 % NaOH

0,95% NaHCO₃

Reagenz B:

4 % $\text{Cu SO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ in Wasser

Das Farbreagenz wurde aus 50 Teilen Reagenz A und 1 Teil Reagenz B zusammengesetzt. 100µl Probe wurden zu 2ml Farbreagenz gegeben, für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Extinktion wurde bei 562 nm gemessen und der Proteingehalt mit Hilfe einer BSA Eichgerade im Konzentrationsbereich von 10 bis 120µg ermittelt.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Blotverfahren

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine der HUVEC- und RPE-Extrakte wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach der Methode von Laemmli (1970) aufgetrennt. Dabei wurden die Proteine mit Hilfe von Natrium-Dodecylsulfat (SDS) denaturiert und in Mizellen gleicher Ladung überführt, die dann entsprechend ihrer molekularen Größe und negativen Ladung im Gel zur Anode („+Pol“) wanderten.

Vorbereitung der Proben

Von den homogenisierten Zellextrakten der HUVEC- und RPE-Zellen wurden jeweils 5µl entnommen und mit weiteren 5µl Proteinextraktionspuffer gemischt (Kapitel 2.5.). Diese Lösungen wurden für 1 Minute in der Minizentrifuge zentrifugiert und dann bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert.

Molekulargewichtsbestimmung

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte mittels SDS-PAGE. Dabei wurden Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht sowie Matrixkomponentenstandards mit HUVEC- und RPE-Zellextrakten verglichen.

Folgende Markerproteine wurden zur Molekulargewichtsbestimmung verwandt:

Markerprotein	apparentes MW (Dalton)
Rainbow-Marker (RM):	
Myosin	200000
Phosphorylase b	97400
BSA	69000
Ovalbumin	46000
Karbonatanhydrase	30000
Trypsininhibitor	21500
Lysozym	14300
Low-Weight-Marker (LWM) :	
Phosphorylase b	94000
Albumin	67000
Ovalbumin	43000
Karbonatanhydrase	30000
Trypsininhibitor	20100
alpha-Lactalbumin	14400

Die Matrixkomponenten Fibronectin, Kollagen IV und Laminin, aus dem Kaninchen gewonnen, wurden als Standards ebenfalls auf die Gele aufgetragen.

Ein aufgereinigter, monoklonaler Antikörper, gegen humane korneale Endothelzellen (HCEC) gerichtet, wurde von Prof. Dr. K. Engelmann etabliert und mit 9.3.E bezeichnet. Er erkennt ein Protein der Basalmembran von HCEC mit einem MG von 130 kD. Die antigene Determinante, die vom AK 9.3.E erkannt wird, wurde ebenfalls in HUVEC- und RPE Extrakten untersucht und nachgewiesen.

Für die Auftrennung der Proteine wurden käufliche Polyacrylamidgele mit einem Gradienten von 10-15%, SDS-Pufferstreifen, und Probenapplikatoren verwendet. Als Apparatur stand eine Gelelektrophoresevorrichtung (Pharmacia) zur Verfügung.

Von den vorbereiteten Proben wurden jeweils 1µl durch den Probenappikator aufgenommen und in die Elektrophoresevorrichtung eingesetzt. Die Gelelektrophorese lief für 30 Minuten mit einer konstanten Stromstärke von 10 mA bei 15 °C.

Silbernitratfärbung

Das anschließend gestartete Färbeprogramm basiert auf den Methoden von Heukeshoven und Dernick (1985) sowie Blum et al. (1987).

Lösung 1 10% Ethanol, 5% Essigsäure

Lösung 2 5% Glutaraldehyd

Lösung 3 H₂O

Lösung 4 0,4% Silbernitrat

Lösung 5 2µg/ml Formaldehyd in 2,5% Natriumkarbonat

Lösung 6 2,7% Natriumthiosulfat

Lösung 7 5% Glycerin

Mit Lösung 1 wurden die zuvor aufgetrennten Gele bei 50°C für 6 Minuten gewaschen.

Dem schloß sich eine Denaturierung und Fällung der Proteine mit Lösung 2 von 6 Minuten bei 50°C an.

Es folgte ein 8 minütiges Waschen bei derselben Temperatur mit Lösung 1, darauf für 4 Minuten mit Lösung 3.

Für die Färbung der Proteine wurde 0,4% ige Silbernitratlösung für 6,5 Minuten bei 40°C angewendet.

Im Anschluß wurde mit Lösung 3 für 1 Minute bei 30°C gespült. Die Lösung 5, als Entwickler angewendet, hatte eine Einwirkungszeit von 4,5 Minuten bei 30°C. Um eine zu starke Hintergrundfärbung zu vermeiden, wurde Lösung 6 für 2 Minuten bei 30°C eingesetzt, die den Färbeporgang abschloß. Das in der Lösung 7 befindliche Glycerin wurde angewendet, um ein Reißen des Gels bei anschließender Austrocknung zu verhindern.

Die gefärbten Gele wurden dunkel und trocken aufbewahrt.

Western Blot

Beim Verfahren des Western Blots (Renart et al., 1979) wurden nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort mit spezifischen Antikörpern behandelt. Auf diese Weise konnten Proteine oder an sie gebundene Substanzen immunologisch charakterisiert werden. Um die gebundenen, spezifischen Antikörper nachzuweisen, wurde die Membran mit einem zweiten, gegen den spezifischen Antikörper gerichteten, Antikörper inkubiert. Dieser zweite Antikörper war mit einem Enzym gekoppelt, so daß bei Zugabe des Substrates eine Farbreaktion eintrat und damit die entsprechende Proteinbande markiert wurde. Durch die Verwendung dieser zwei Antikörper trat außerdem ein Verstärkungseffekt ein.

Zuerst wurden die Polypeptide mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt. Für den Proteintransfer auf Nitrozellulose wurde das Gel nach beendetem Lauf von der Trägerfolie abgetrennt und auf die

passend zugeschnittene, zuvor in Transferpuffer eingeweichte, Nitrozellulose aufgebracht. Die in entsprechender Größe zugeschnittenen Filterpapierstücke wurden in Transferpuffer eingeweicht.

Transferpuffer : 25 mM Tris
192 mM Glycin
20 % Methanol

Nacheinander wurden in die Elektrotrotransfereinheit zuerst drei Lagen Filterpapier, dann die Nitrozellulose, das Gel und anschließend drei Lagen Filterpapier übereinander geschichtet. Der Proteintransfer erfolgte für 20 Minuten bei einer Stromstärke von 25 mA.

Immunoblotting

Die Nitrozellulosemembran wurde dreimal mit PBT (0,1% Tween 20 in PBS) gewaschen. Das Detergens Tween 20 hatte die Aufgabe, die Oberflächenspannung des Wasser herunterzusetzen. Danach wurde die Membran mit 5%iger BSA-Lösung +0,02% Tween 20 in PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt, um unspezifischen Bindungen von IgG-Molekülen vorzubeugen.

Anschließend wurde die Nitrozellulose zweimal mit BSA-Waschpuffer gewaschen.

BSA-Waschpuffer: 0,5% BSA+0,02% Tween, in PBS

Die Lösung des ersten Antikörper wurde in BSA-Waschpuffer in der entsprechenden Verdünnung angesetzt und die Nitrozellulose wurde eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert. Antikörper gegen folgende Antigene wurden verwendet:

Antigen	Quelle	Art	Verdünnung
Laminin	Kaninchen	Polyklonal	1:50
Kollagen IV	Kaninchen	Klon COL-94	1:100
Fibronectin	Kaninchen	Polyklonal	1:100
9.3.E. (aufgereinigt)	Maus	Monoklonal	1:10

Es folgte ein zweimaliger Waschgang und darauf die Inkubation für 30 Minuten bei RT mit dem zweiten Antikörper (Horseradish-Peroxidase-konjugierte Anti-Maus bzw-Kaninchen-Immunglobuline), in der Verdünnung 1:100. Da die Peroxidase lichtempfindlich ist, wurden der zuletzt beschriebene und alle weiteren Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach dem Waschen wurde die Nitrozellulose zuletzt in Tris-Puffer gewaschen.

Tris-Puffer 50mM Tris, pH 7,35

Schließlich wurde der Entwickler, der das Substrat für das Enzym enthielt, zugegeben.

Entwickler: 3mg 4-Chlor-1-naphthol in 1ml Methanol lösen. Anschließend 5 ml

Tris-Puffer und $20\mu\text{l H}_2\text{O}_2$ -Lösung (30% ig) direkt vor der Anwendung zufügen.

Die Einwirkzeit des Entwicklers betrug zwischen 2-10 Minuten. Nach der eingetretenen Färbung wurde zweimal mit PBS-Lösung abgestoppt, die Nitrozellulose getrocknet und im Dunkeln aufbewahrt.

Dot Blot

Bei diesem Verfahren wurden die homogenisierten Zellextrakte beider Zellarten verwendet und eine quantitative Aussage über die Bildung der Matrixkomponente Fibronectin innerhalb einer Passage bzw über mehrere Passagen hinweg gemacht.

Probenvorbereitung

Der Proteingehalt jede Probe wurde auf eine Konzentration von 1mg/ml eingestellt und eine Verdünnungsreihe von 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 hergestellt. Auf die zugeschnittene Nitrozellulose wurden von jeder Lösung $1\mu\text{m}$ aufgetragen.

Eine Standardreihe für Fibronectin mit der Ausgangskonzentration von 1mg/ml wurde in einer Verdünnung von 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 und 1: 1000000 auf die Nitrozellulose aufgetragen.

Die Proben wurden im Anschluß, wie bereits im Abschnitt 2.2.4. beschrieben, nach dem Verfahren des Immunoblotting untersucht.

2.2.7. Dokumentation der Ergebnisse

Die an den Zellkulturen und Gewebeschnitten durchgeführten Färbungen wurden fotografisch mit dem am Mikroskop befindlichen Fotoautomaten (Leitz Fluovert Wild) festgehalten. Die Western Blots und silbernitratgefärbten Gele wurden mit Unterstützung des Fotolabors der Augenuniversitätsklinik Hamburg an der Reprovit fotografiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zellkultur

Für die immunhistochemische und morphologische Charakterisierung der humanen retinalen Pigmentepithelzellen und der vaskulären Endothelzellen der Nabelschnurvene war das Anlegen ihrer Zellkulturen die Voraussetzung. Für die Untersuchungen war von Bedeutung, daß reine Zellkulturen vorlagen. Das Wachstumsverhalten und die Morphologie beider Zellarten wurden über mehrere Passagen hinweg beobachtet und fanden Berücksichtigung bei den immunologischen Untersuchungen.

Die Identität der RPE und HUVEC wurde hinsichtlich der antigenen Determinanten gegen Antikörper der zellassozierten Proteine, der Intermediärfilamente, der Matrixkomponenten und der neuroendokrin/neuroektodermalen Marker in Färbungen und an Gewebeschnitten immunhistochemisch untersucht.

3.1.1 Morphologie und Wachstumsverhalten der RPE Zellkultur

Nach erfolgreicher Isolierung benötigten die Primärkulturen der RPE Zellen 8-10 Tage zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers. Die Zellen waren epitheloid bis hexagonal und enthielten Pigment (Abbildung 1). Der Kern und die Zellgrenzen waren gut abgrenzbar.

Bereits bei der Proliferation der Zellen in der Primärkultur war ein Verlust ihres Pigmentgehaltes unter dem Phasenkontrastmikroskop zu beobachten. Das einsetzende Wachstum der Zellen war inselförmig. Das Umsetzen in die 1. Passage erfolgte in einem Verhältnis von 1:2. Die zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers benötigte Zeit betrug 4-5 Tage. Dieser Monolayer zeigte die typisch wabenähnliche, gleichmäßige Anordnung der Zellen. Diese enthielten nur noch Melaninspuren und teilweise waren Konglomerate von Pigment außerhalb der Zelle zu erkennen (Abbildung 2).

Die weitere Subkultivierung erfolgte im Verhältnis 1:4, da die Zellen ein vermehrtes Wachstum zeigten.

In den Passagen 2-4 war ein ausgeprägtes Proliferationsverhalten mit einer Generationszeit von 2-3 Tagen zu beobachten. Das Melanin war nun völlig verschwunden (Abbildung 3).

Für die immunhistochemischen Färbungen fanden die Zellen der 1. bis 5. Passage im sub- bis konfluenten Zustand Anwendung.

Die Morphologie änderte sich bei den RPE Zellen im Verlauf der Subkultivierung dahingehend, daß sie länglicher, fibroblastoider wurden und ihre Kontaktinhibition verloren (Abbildung 4). Eine weitere Beobachtung war, daß einige Zellkulturen stärker proliferierten, und damit die morphologischen Veränderungen rascher auftraten.

Ab der 6.-7. Passage nahm das Zellzytoplasma an Volumen zu und die Zellen erschienen morphologisch Zellen größer und abgerundet. Die Fähigkeit zur Zellteilung war vermindert, was als Ausdruck der beginnenden Seneszenz zu werten war (Abbildung 5).

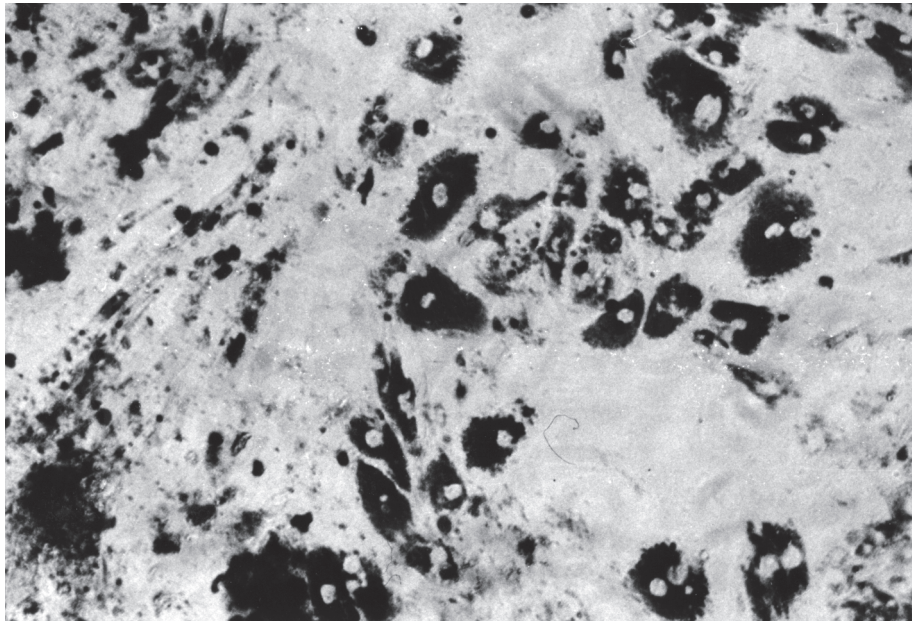


Abbildung 1 Semikonfluente Primärkultur der retinalen Pigmentepithelzellen 5 Tage nach Aussaat. Die Zellen sind epitheloid und melanin-haltig.
(Vergrößerung 200-fach)

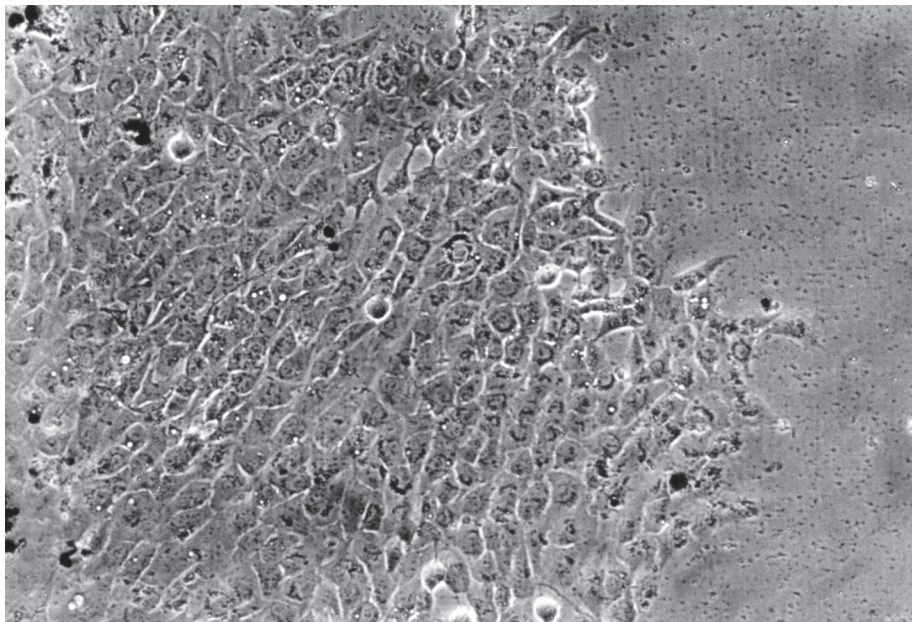


Abbildung 2 Kultivierte RPE Zellen der 1. Passage mit typischer, wabenähnlicher Morphologie und Spuren von Melanin, in Inseln wachsend.
(Vergrößerung 100-fach)

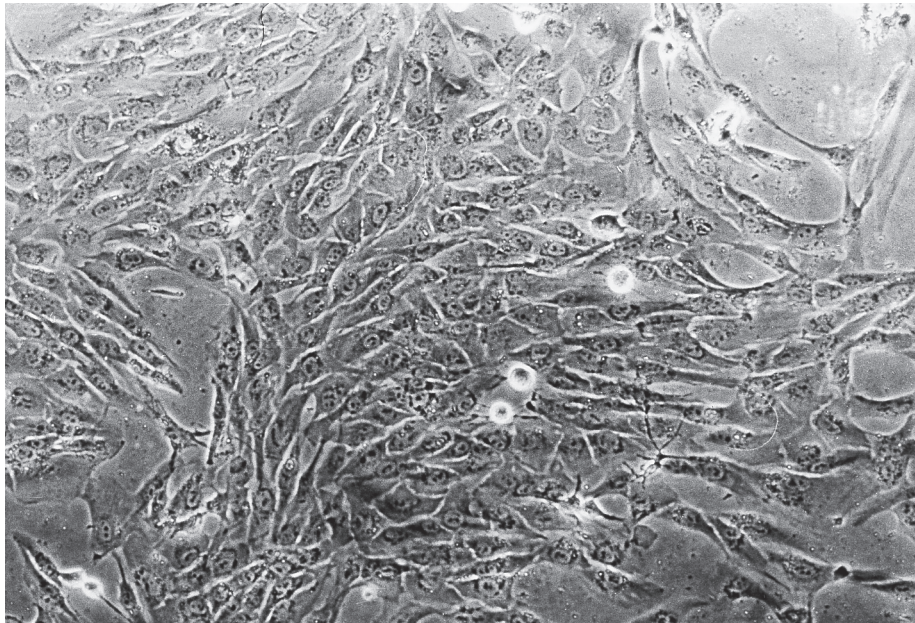


Abbildung 3 Subkonfluente Kultur von RPE in der 2. Passage. Im Zentrum haben die Zellen typische Morphologie, der Randbereich zeigt elongierte Zellen. Zellverbände beginnen sich „fischgräten“artig zu verbinden. In diesen Arealen finden sich langgestreckte Zellkerne.(Vergrößerung 100-fach)

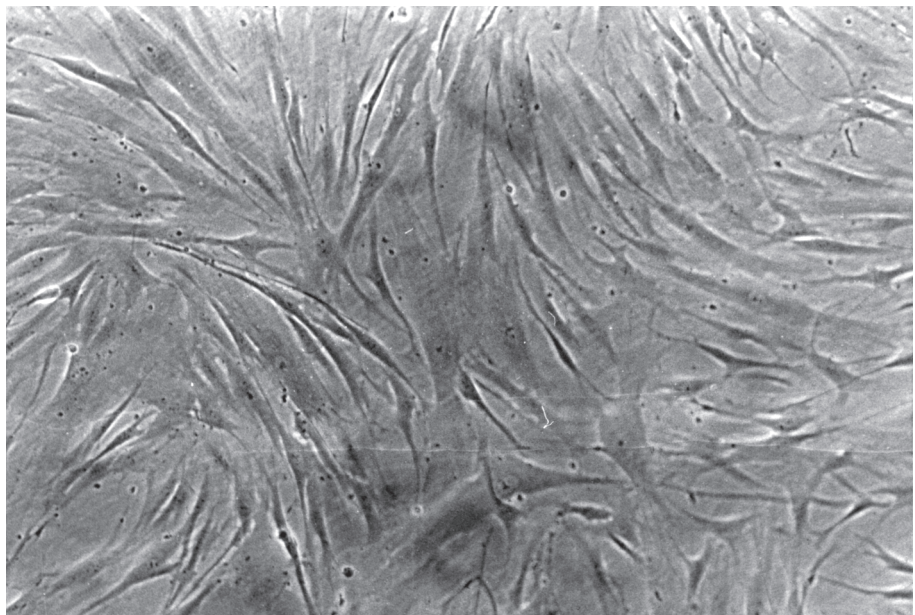


Abbildung 4 Fibroblasten-ähnliche, stark proliferierende RPE Kultur der 4. Passage nach 5 Tagen Kultivierung mit Zunahme des Fischgrätencharakters. Zellen sind stark elongiert und haben ihre Kontaktinhibition verloren. (Vergrößerung 100-fach)

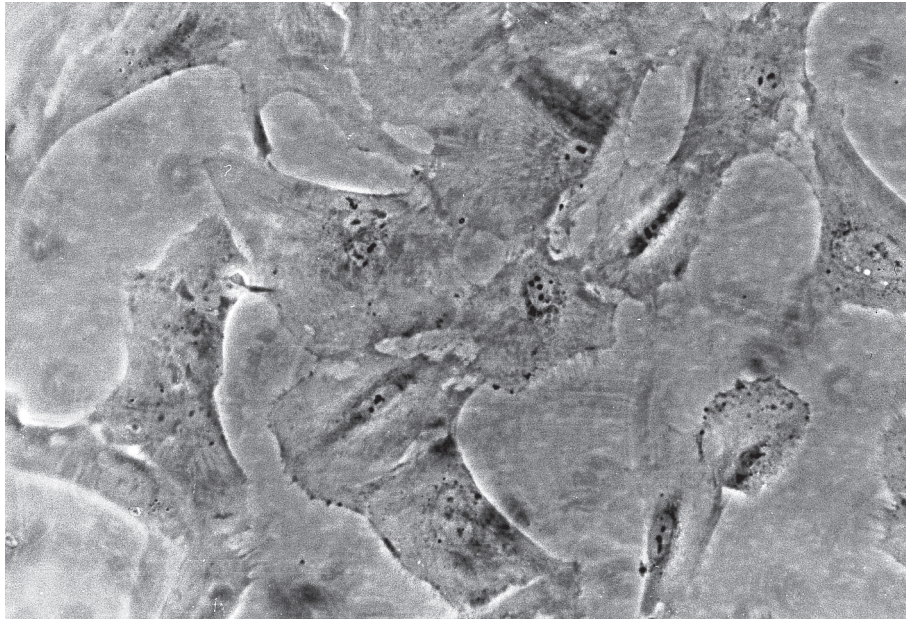


Abbildung 5 Seneszente RPE Zellen in der 7. Passage. Sie zeigen große Zellen mit stark vermehrtem Zytoplasma im Vergleich zu kleinen Kernen. (Vergrößerung 200-fach)

3.1.2 Morphologie und Wachstumsverhalten der HUVEC Zellkultur

Bei der Kultivierung der vaskulären Endothelzellen aus der Nabelschnurvene zeigten die Zellen der Primärkultur bereits nach 2 Tagen einen konfluenten Monolayer, der unter dem Phasenkontrastmikroskop eine gleichmäßige und kopfsteinpflasterähnliche Anordnung aufwies (Abbildung 6). Die vaskulären Endothelzellen waren im Vergleich zu den RPE Zellen in Kultur kleiner und nach 24 Stunden wurde bereits ein konfluenter, gleichmäßiger Zellrasen gebildet. Die vaskulären Endothelzellen wurden 7 Passagen hindurch kultiviert und in einem Verhältnis von 1:4 umgesetzt. Dabei wurden keine großen morphologischen Veränderungen beobachtet. Ab der 6. Passage zeigten einige Zellen eine verminderte Proliferationsrate. Die dabei entstandenen zellfreien Bereiche wurden durch größere, atypisch geformte Zellen besiedelt, die ein längliches Aussehen erhielten. Diese unterschieden sich dennoch von den Zellen, die als fibroblastoide RPE Zellen bezeichnet wurden.

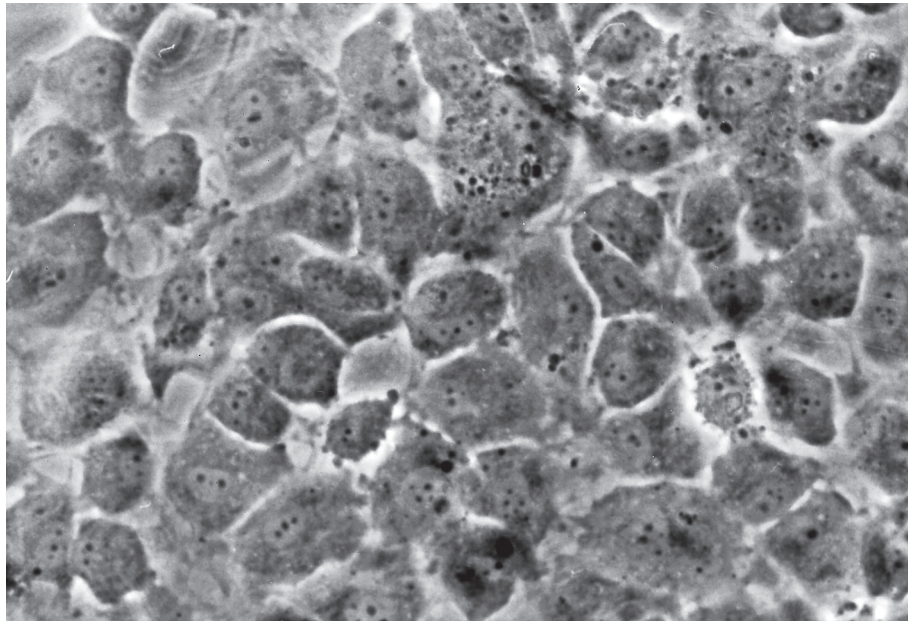


Abbildung 6 Zellkultur von vaskulären Endothelzellen der 1. Passage mit typischer kopfsteinplasterartigen Morphologie. (Vergrößerung 320-fach)

3.2 Qualitativer immunologischer Proteinnachweis an Zellkulturen und Gewebeschnitten

Bei den immunologischen Färbungen in der Zellkultur wurden die Alkalische Phosphatase, die Meerrettich Peroxidase- und die Immunfluoreszenzfärbung an jeweils drei verschiedenen Zellkulturen der RPE Zellen und HUVEC durchgeführt. Dabei wurden die Antikörperverdünnungen sowie die einzelnen Arbeitsschritte nicht verändert. War das Ergebnis nicht eindeutig, wurde die Anzahl der Färbungen von 3 auf bis zu 7 Durchgänge erhöht.

Beim Nachweis der zu untersuchenden antigenen Determinanten an den Gewebeschnitten standen ein Bulbus und 2 Nabelschnüre zur Verfügung, die pro Antikörper jeweils 3 mal mit dem LSAB2-Kit der Firma Dako gefärbt wurden.

Als Positivkontrolle wurde der Nachweis von Aktin in der Zellkultur und am Gewebeschnitt erbracht. Aktin, als ein wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts beider Zelltypen zeigte eine eindeutig positive und intensive Anfärbung. Für die Negativkontrolle fanden Antikörper aus der Maus und dem Kaninchen Anwendung. Während keine Reaktion mit dem Antikörper aus der Maus auftrat, war eine verstärkte Hintergrundfärbung beim Antikörper aus dem Kaninchen in der Zellkultur zu beobachten. Diese konnte beim Vergleich mit der positiven Antikörperreaktion vernachlässigt werden. Bei der Kontrollfärbung der Gewebeschnitte war das Ergebnis eindeutig negativ.

3.2.1 Matrixproteine

Die HUVEC und das RPE synthetisieren eine auch mikroskopisch sichtbare extrazelluläre Matrix, die sich unter anderem aus den Bestandteilen Fibronectin, Laminin und Kollagen IV zusammensetzt. Die Bildung der einzelnen Matrixkomponenten wurde mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Für diesen Nachweis wurden die Zellen 1-5 Wochen auf Klonierungsplatten gezüchtet. Die drei Zellkulturen wurden teilweise einer Vorbehandlung mit Ammoniumhydroxid unterzogen, die eine Lyse der Zellen bewirkt, wie im Kapitel 2.3 bereits beschrieben. Auf diese wird beim Auswerten der Abbildungen noch einmal eingegangen.

Zusätzlich wurde eine Kinetik erstellt, die den Zusammenhang zwischen Alter der Zellkultur und gebildeter Menge beispielhaft für Fibronectin quantitativ bei beiden Zelltypen darstellt (Kapitel 3.3.3).

Fibronectin

In den Kulturen von RPE Zellen und HUVEC wurde der extrazelluläre Matrixbestandteil Fibronectin mittels eines polyklonalen Antikörpers nachgewiesen. So begannen die Zellen beider Zellarten ab dem 4.-5. Tag eine Gitterstruktur aus Fibronectinfasern auszubilden, welche nach 3-5 Wochen die gesamte Fläche des Zellrasens einnahm. Bereits ab der 2. Woche wurde ein immer dichter werdendes Netzwerk aus Fibronectin gebildet..

In den RPE Kulturen entstand ein feinmaschiges, stark vernetztes Muster aus extrazellulären Fibronectinfasern, erkennbar in Abbildung 7 mit Ammoniumhydroxid in der 3. Woche vorbehandelt, sowie ohne Vorbehandlung in der 5. Passage auf der Abbildung 8. Hierbei ließ sich eine eindeutige Dichtezunahme mit zunehmender Kulturdauer erkennen.

Bei den vaskulären Endothelzellen zeigten die Zellränder zunächst eine heterogene, schwache Anfärbung (Abbildung 9), die aber mit zunehmender Faserdichte verschwand. Im Unterschied zu den RPE Zellen bildeten die HUVEC extrazellulär ein großmaschiges und flächiges Strukturnetz aus (Abbildung 10).

Im Vergleich zu Laminin und Kollagen IV konnte Fibronectin bereits nach 3 tägiger Kulturdauer extrazellulär nachgewiesen werden.



Abbildung 7 Immunologischer Nachweis von Fibronectin in einer RPE Kultur. Die Zellen befanden sich in der 3. Passage und waren 16 Tage kultiviert. Vor der Färbung wurde die Kultur mit Ammoniumhydroxid zur Lyse der Zellen vorbehandelt. Der Sekundärantikörper war mit AP markiert. (Vergrößerung 100-fach)

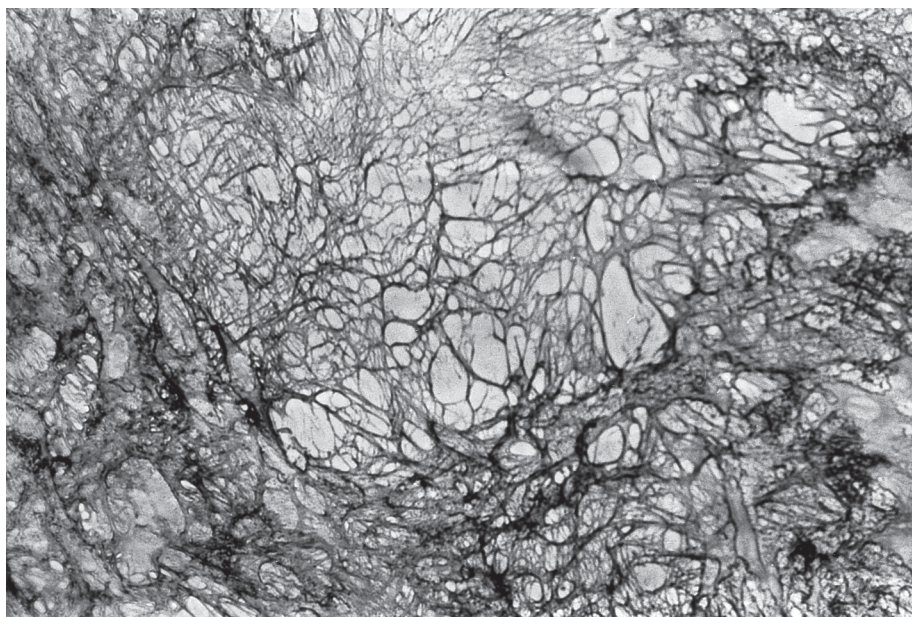


Abbildung 8 Immunologischer Nachweis von Fibronectin in einer RPE Kultur, die 30 Tage kultiviert wurden. Stark vernetztes Gitter aus Fibronectin extrazellulär zu erkennen. Der Sekundärantikörper war mit AP markiert. (Vergrößerung 100-fach)

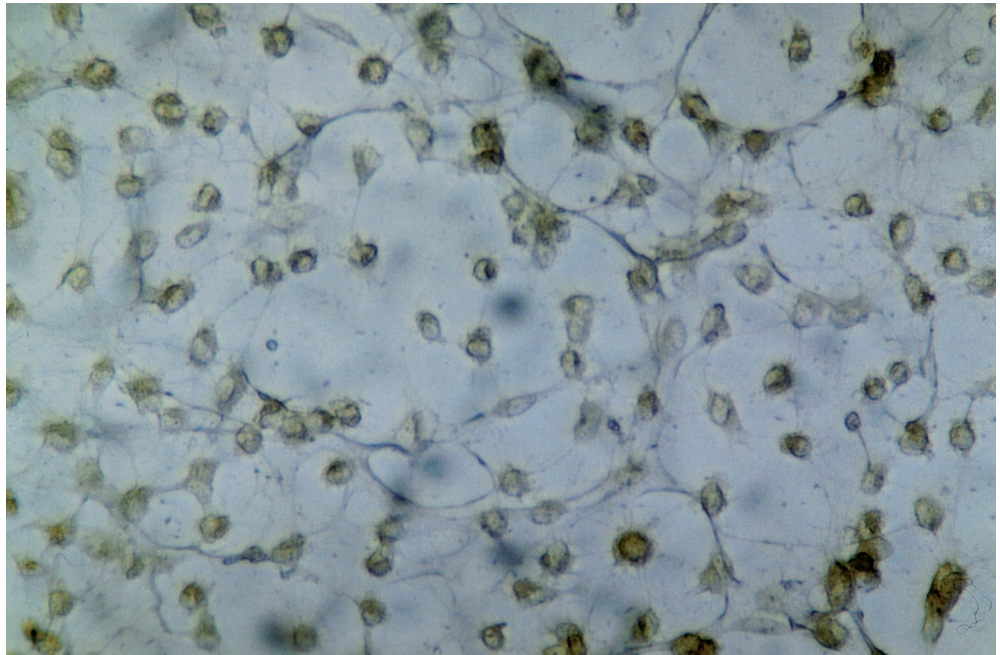


Abbildung 9 Immunologischer Nachweis von Fibronectin in einer HUVEC Kultur der 1. Passage nach 9 Tagen Kultivierung. Beginnende Fibronectinbildung extrazellulär sowie schwache, unregelmäßige Zellrandfärbung. Der Sekundärantikörper war mit AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

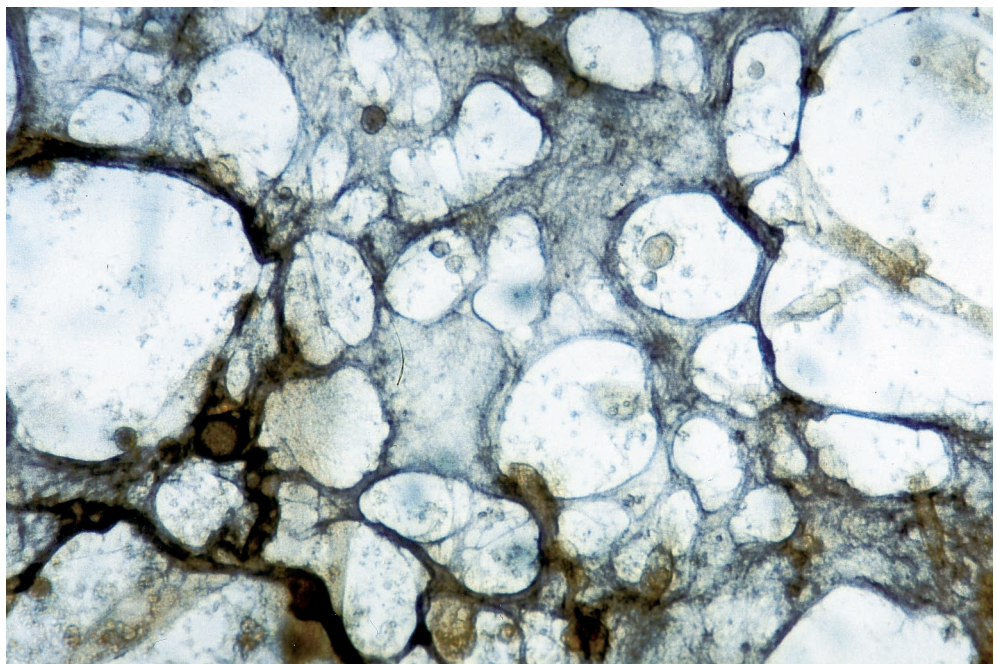


Abbildung 10 Immunologischer Nachweis von Fibronectin in einer Kultur vaskulärer Endothelzellen der 3. Passage. Die Kulturdauer betrug 25 Tage. Das extrazelluläre Fasernetz aus Fibronectin erscheint großmaschiger und flächiger bei den HUVEC. Der Sekundärantikörper war mit AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

Laminin

Bei den Untersuchungen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Laminin zeigten beide Zellarten in der Kultur eine Anfärbung. Die Laminin produzierenden Zellen zeigten nach 2 Wochen erste Anzeichen von Lamininproduktion. Diese äußerte sich in unregelmäßig starken Zytoplasmaanfärbungen, unter Aussparung des Nukleus (Abbildungen 11 und 13). Wurden die Zellen über 4 Wochen kultiviert, bildeten sich Lamininfasern zwischen den Zellen, deren Struktur aber nicht so gleichmäßig und dicht wie beim Fibronektin war.

Nach Verwendung von Ammoniumhydroxid-Lösung, die die Zellen eliminierte, konnte die netzartige Struktur der Lamininfasern nachgewiesen werden (Abbildungen 12 und 14).

Der Nachweis des Antigens gegen den polyklonalen Antikörper Laminin konnte nicht eindeutig am Gewebeschnitt des Auges und der Nabelschnur für die RPE und HUVEC in situ erbracht werden, da keine sichere Zuordnung der extrazellulär gefärbten Strukturen zu den HUVEC und RPE möglich war. So enthielt der pathologisch erweiterte subretinale Raum am Gewebeschnitt des Auges angefärbte Strukturen (Abbildung 15).

Im Gewebeschnitt der Nabelschnurvene wies die unter den HUVEC befindliche Struktur, bei der es sich um die Basalmembran dieser Zellen handelt, eine deutliche Färbung auf.

Eine eindeutige Färbung zeigten auch Muskel und Stromazellen im Gefäßanschnitt der Nabelschnurvene (Abbildung 16).

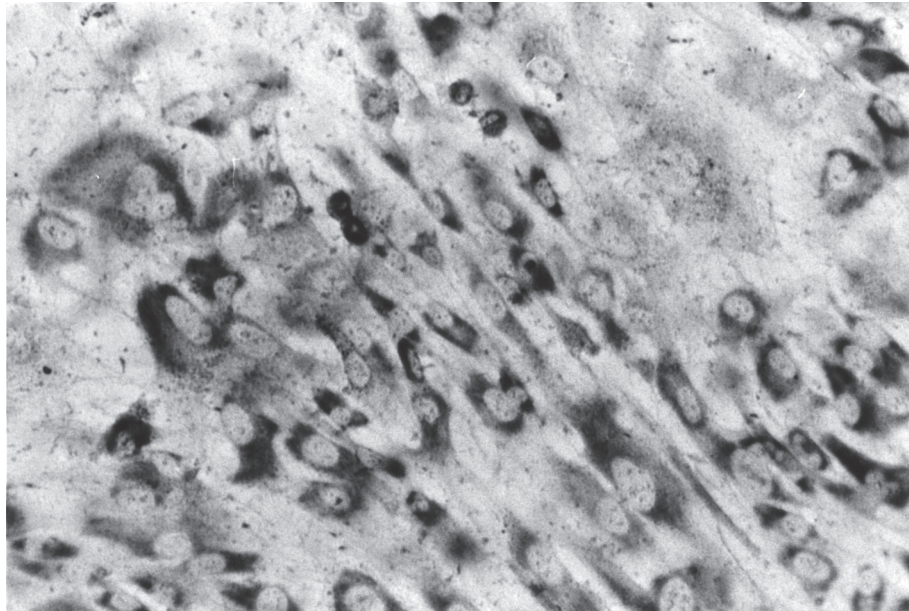


Abbildung 11 Immunologischer Nachweis von Laminin in kultivierten RPE Zellen der 3. Passage nach 15 Tagen Kultivierung. Das Zytoplasma der Zellen zeigt unregelmäßige Anfärbungen unter Aussparung des Kernes. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)

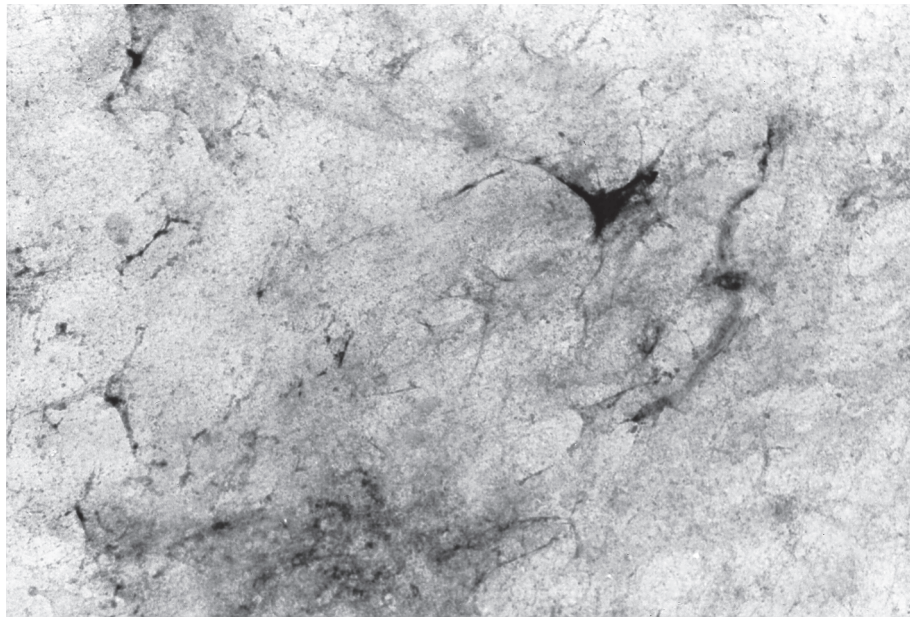


Abbildung 12 Immunologischer Nachweis von Laminin in RPE Zellen der 5. Passage. Die Kultur wurde zur Lyse der Zellen mit Ammoniumhydroxid vorbehandelt. Das Bild zeigt die typische Lamininstruktur. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

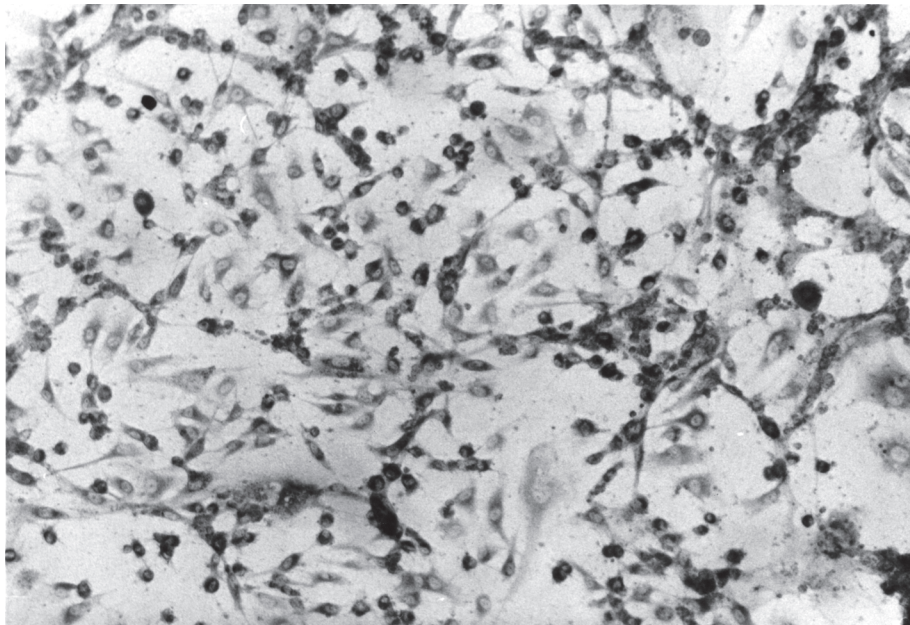


Abbildung 13 Immunologischer Nachweis von Laminin in vaskulären Endothelzellen der 3. Passage. Die Zellen wurden nach 15 Tagen Zellkultur gefärbt. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

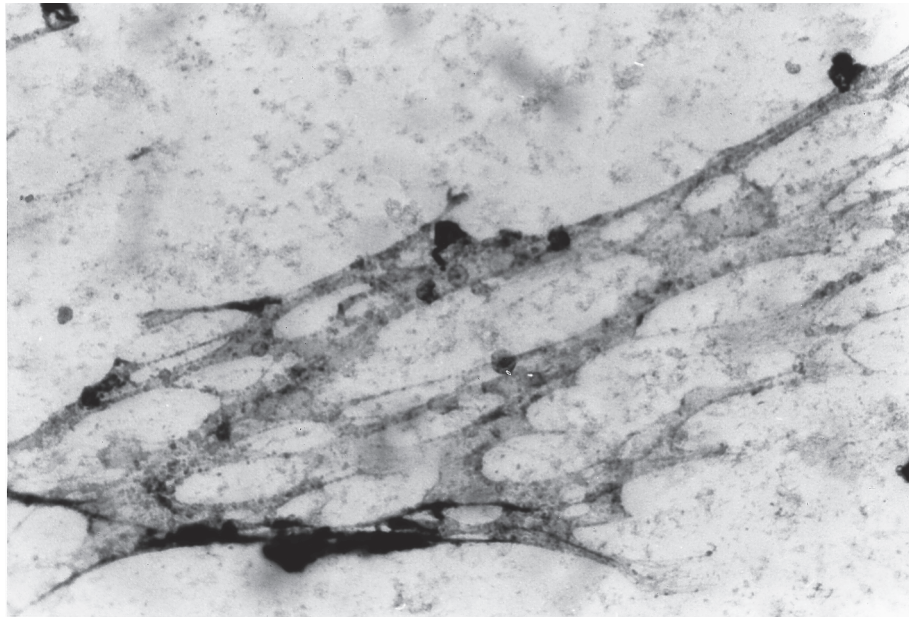
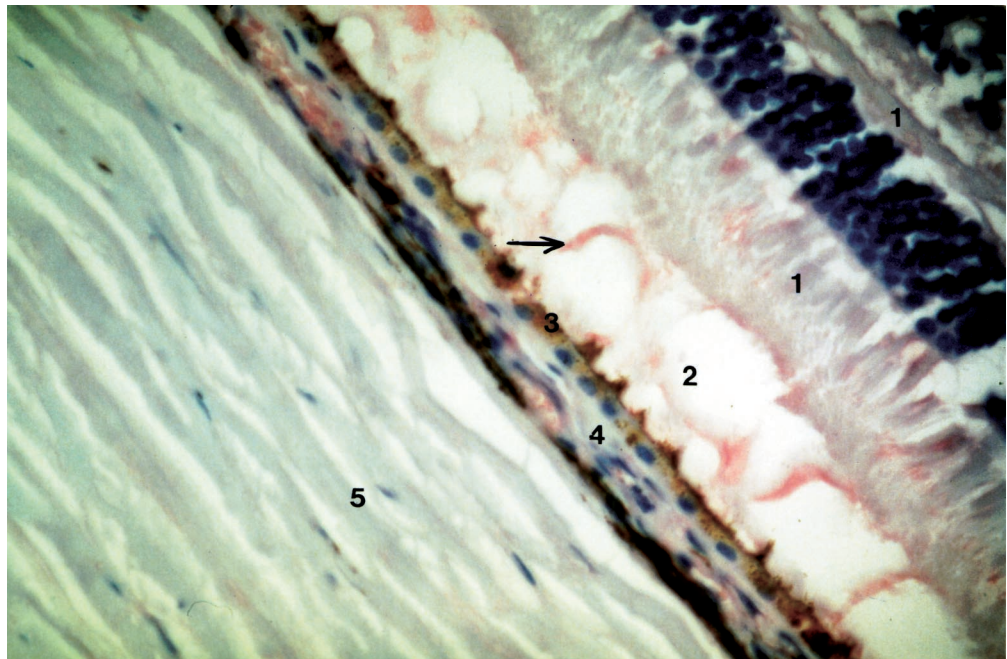
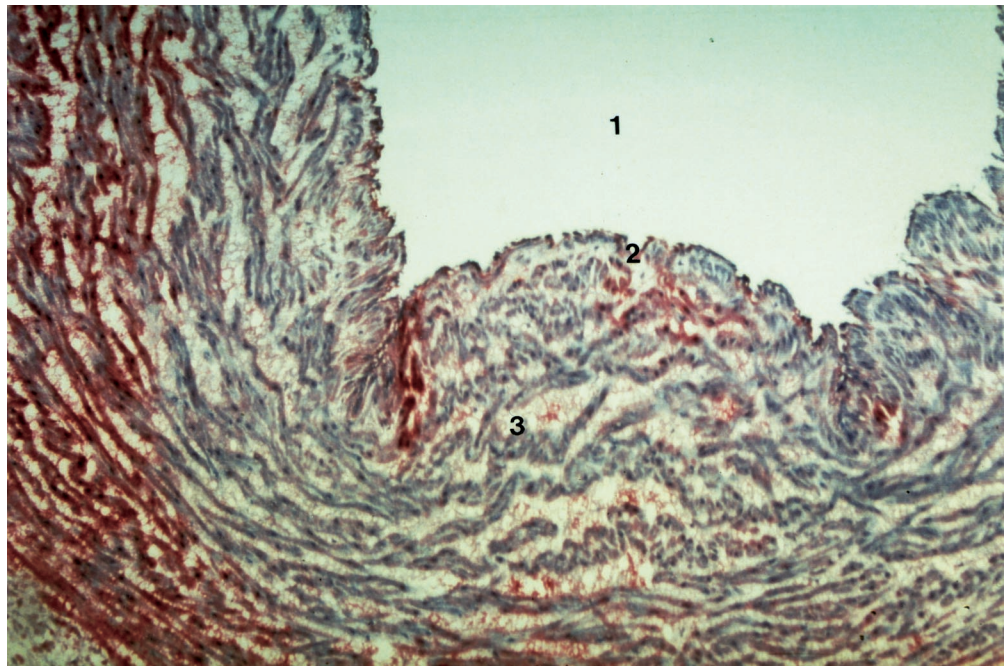


Abbildung 14 Immunologischer Nachweis von Laminin in der Kultur von HUVEC in der 2. Passage nach 24 Tagen Kultivierung. Es erfolgte eine Vorbehandlung mit Ammoniumhydroxid. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)



- 1- neurosensorische Retina (1., 2., 3. Neuron)
- 2- subretinaler Raum
- 3- RPE und Bruch'sche Lamina
- 4- Choriokapillaris und Lamina vasculosa choroideae und Choriokapillaries
- 5- Sklera

Abbildung 15 Gewebeschnitt des Auges ohne Nachweis von Laminin im RPE. Anfärbung einer Struktur im subretinalen Raum (Pfeil). Die Färbung wurde mit dem LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 40-fach).



- 1- Lumen der Vena umbilicalis
- 2- HUVEC (erste, lumenwärts gerichtete, einschichtige Zellschicht)
- 3- Intima, Media und Adventitia mit Muskel- und Stromzellen

Abbildung 16 Gewebeschnitt der Nabelschnur ohne Nachweis von Laminin in den HUVEC Zellen. Darunter befindliche Membran, Muskel- und Stromazellen zeigen Anfärbung. Die Färbung wurde mit dem LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 20-fach)

Kollagen IV

In der Kultur der RPE Zellen und HUVEC band der monoklonale Antikörper gegen Kollagen IV. Diese Matrixkomponente war frühestens nach 2 und optimal nach 3-4 Wochen Kulturdauer eindeutig an ihrer stark vernetzten, mehrschichtigen Faserstruktur zu erkennen. Zum Nachweis wurde die Alkalische Phosphatase- und Immunfluoreszenzfärbung angewendet. Die Intensität der Färbung nahm mit der Kultivierungszeit der Zellen zu.

Bei der RPE Kultur konnte eine wabenähnliche Gitterstruktur erkannt werden, die in einigen Bereichen verdichteter erschien (Abbildung 17).

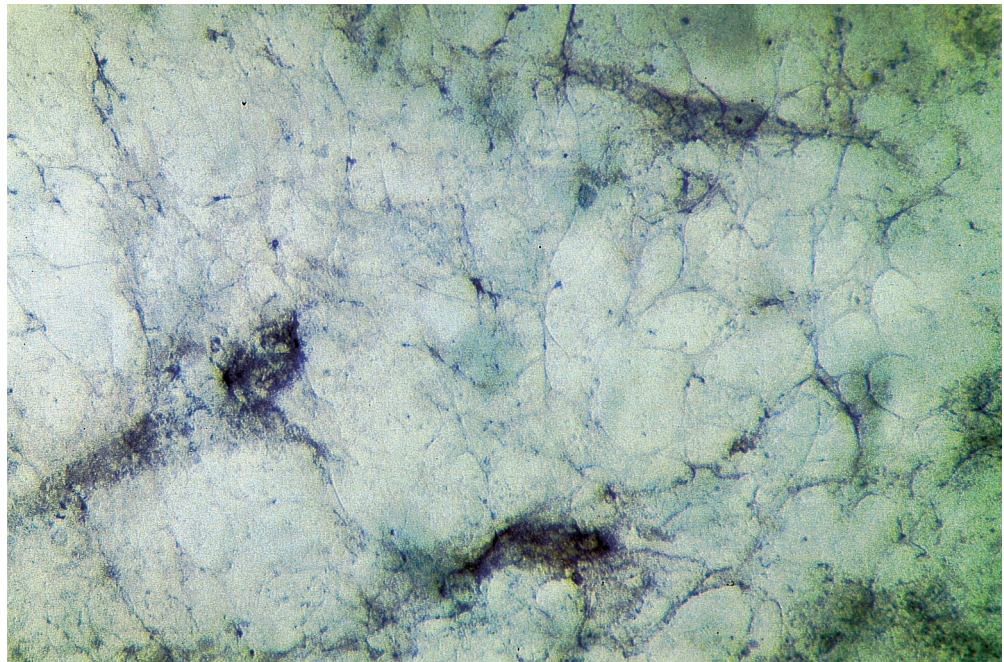


Abbildung 17 Immunologischer Nachweis von Kollagen IV in der Zellkultur vom RPE der 4. Passage. Die Zellen waren vor der Färbung 20 Tage kultiviert worden. Wabenähnliche Gitterstruktur aus Kollagen IV mit lokalen Verdichtungen. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 100-fach)

Beim Immunfluoreszenznachweis des Antikörpers gegen Kollagen IV waren die kollagenen Netzstränge zusammengelagert und sehr dicht (Abbildung 18).

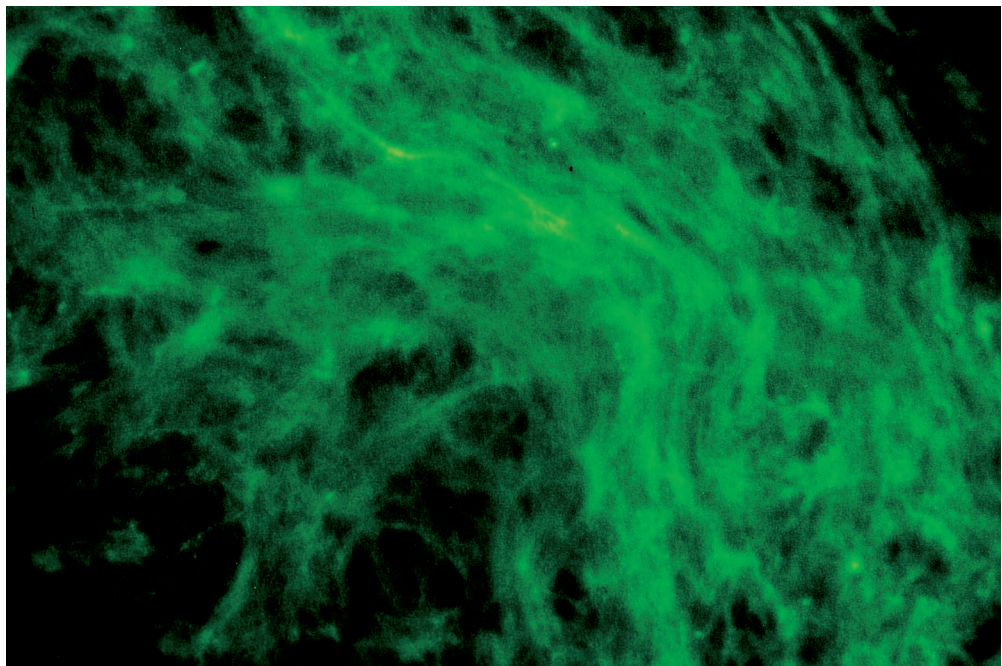


Abbildung 18 Immunfluoreszenznachweis von Kollagen IV in 5 Wochen kultivierten RPE der 2. Passage. Der Sekundärantikörper war FITC konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

Bei den vaskulären Endothelzellen in der Zellkultur zeigte der Verlauf zunächst eine starke Anfärbung des Zytoplasmas der Zellen sowie der Zellränder. Es schien, als würden die kollagenen Fasern strahlenförmig außerhalb der Zellbegrenzung auseinanderlaufen (Abbildung 19).

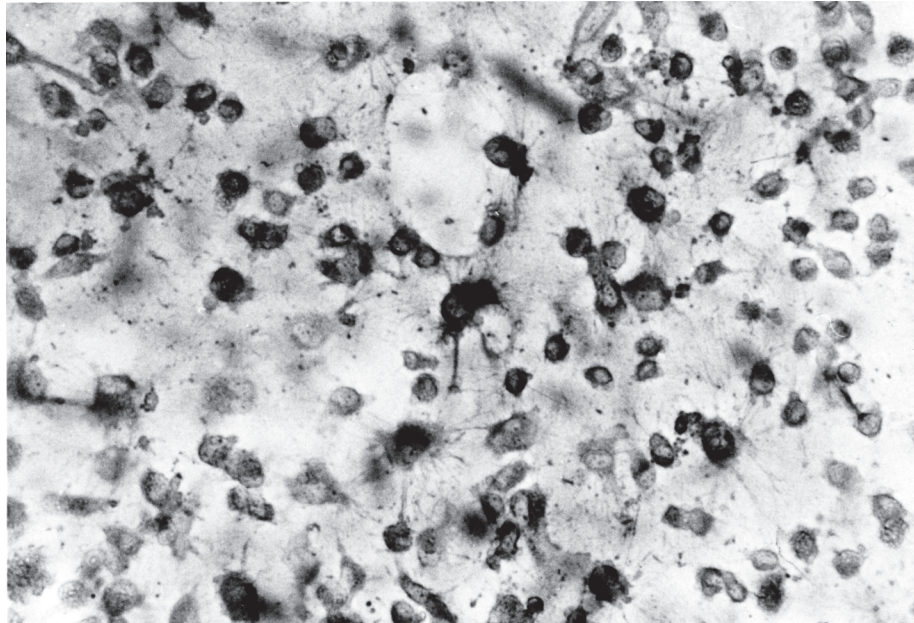


Abbildung 19 Immunologischer Nachweis von Kollagen IV in kultivierten vaskulären Endothelzellen der 3. Passage nach 16 Tagen Kultivierung. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

Die HUVEC bildeten ein großmaschiges Kollagenmuster mit unterschiedlich dicken Netzsträngen, die in der Immunfluoreszenzfärbung gut zu erkennen waren.

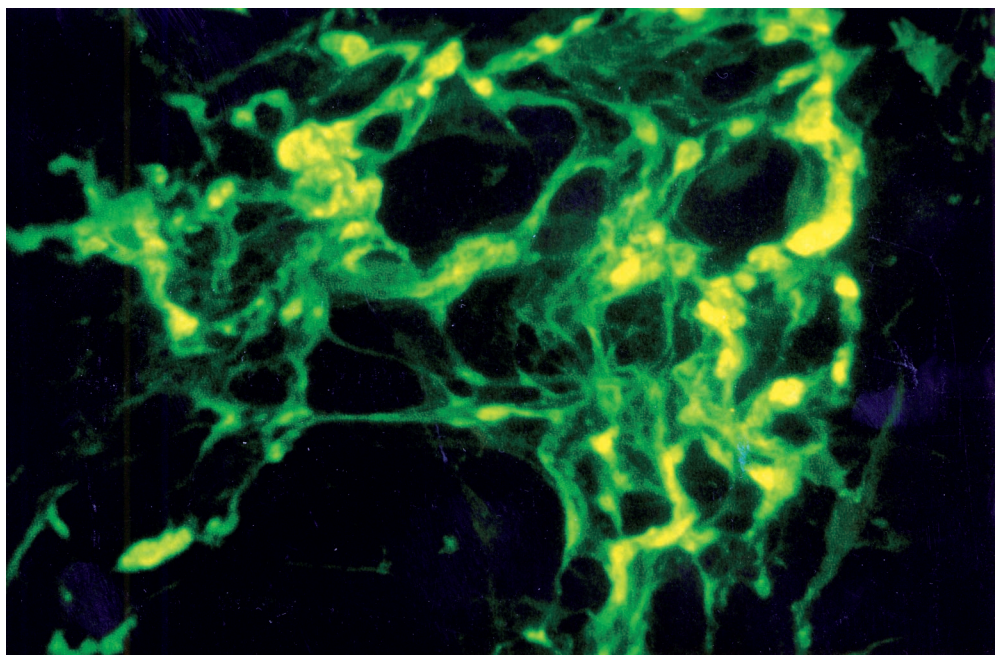


Abbildung 20 Immunfluoreszenznachweis von Kollagen IV bei kultivierten HUVEC, deren Kultivierungsdauer 31 Tage betrug. Der Sekundärantikörper war FITC konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

3.2.2 Zellassozierte Proteine

Für die Charakterisierung der vaskulären Endothelzellen wurden typische Endothelmarker, wie der von Willebrand Faktor, Endoglin, CD 31, Ulex europaeus Lektin und Antithrombin III verwendet.

von Willebrand Faktor (Faktor VIII)

Dieser, als typischer Endothelmarker eingesetzte, polyklonale Antikörper zeigte bei beiden Zelltypen eine Anfärbung in vitro. Dabei war die Anfärbung der RPE schwächer ausgeprägt, aber eindeutig (Abbildung 21). Der Zellkern blieb ungefärbt, das Zytoplasma, insbesondere in Kernnähe, wurde gefärbt.

Der Nachweis des Antigens wurde an 7 verschiedenen RPE Zelllinien 10 mal wiederholt, und der eingesetzte Antikörper wies immer eine Bindung gegen den von Willebrand Faktor auf.

Bei den kultivierten HUVEC war das gesamte Zytoplasma angefärbt und wurde mit einer Alkalischen Phosphatase- und Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (Abbildungen 22 und 23).

Im Gewebeschnitt der Nabelschnur wurde das Endothel der Nabelschnurvene mit dem Antikörper gegen den von Willebrand Faktor nachgewiesen (Abbildung 24). Im Augenpräparat wies das RPE keine markierten Strukturen gegen den von Willebrand Faktor auf.

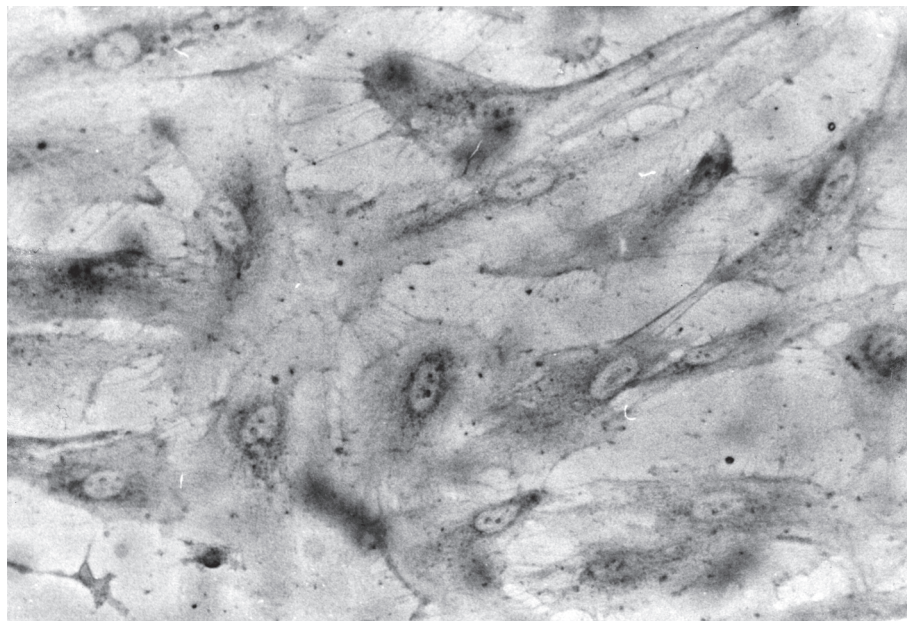


Abbildung 21 Immunologischer Nachweis des von Willebrand Faktors an RPE Zellen der 4. Passage, nach 14 Tagen Kulturdauer. Kernnahe Zytoplasmaanfärbungen sind erkennbar. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

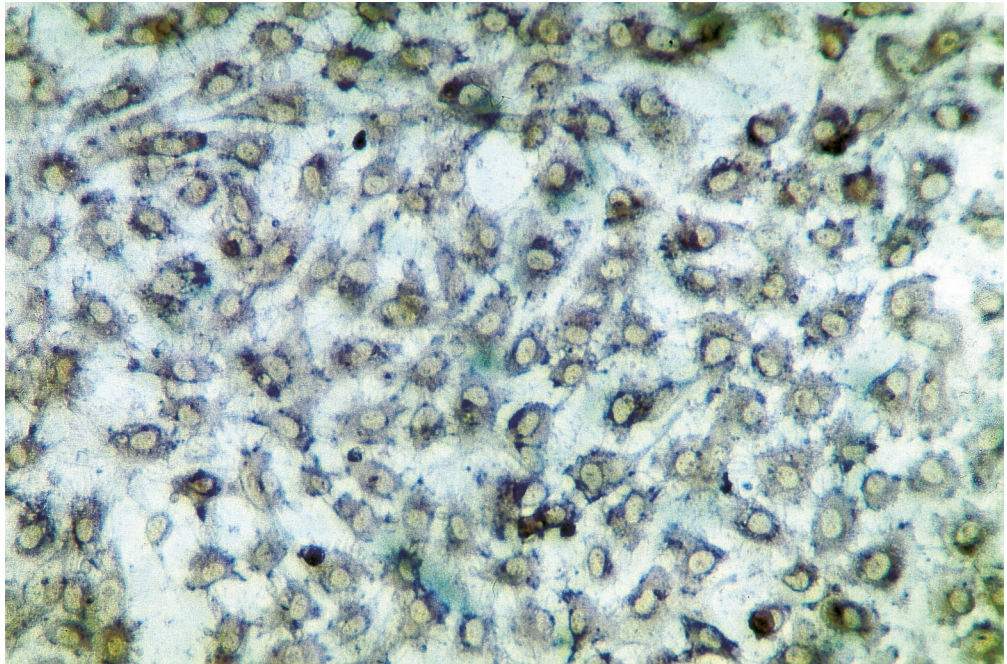


Abbildung 22 Immunologischer Nachweis des von Willebrand Faktors an kultivierten vaskulären Endothelzellen, der 3. Passage nach 3 Tagen Kultivierung. Es sind Anfärbungen des gesamten Zytoplasmas in den HUVEC ersichtlich. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)

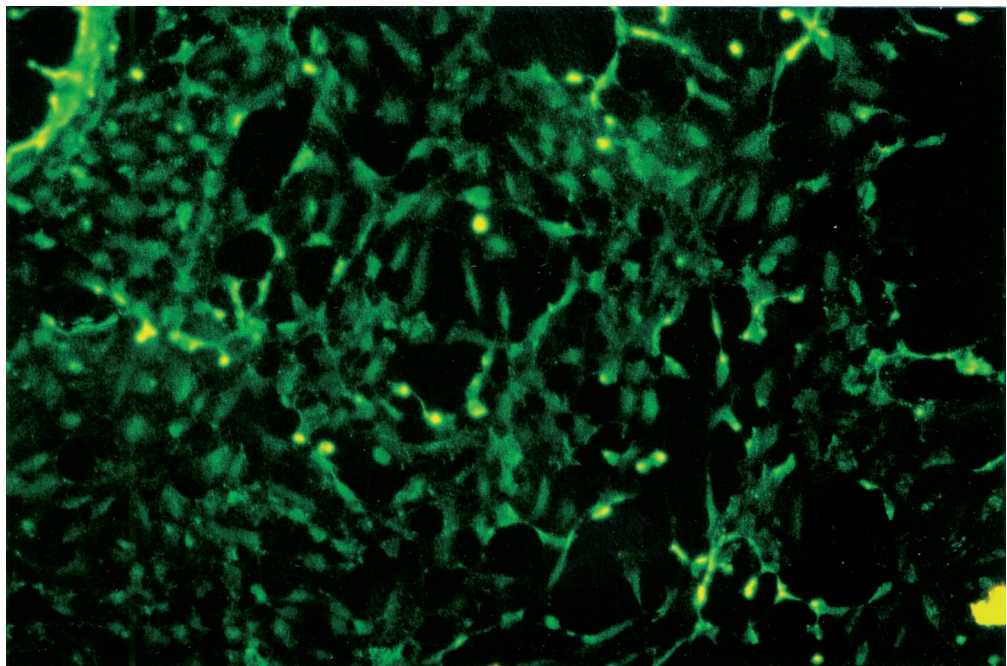
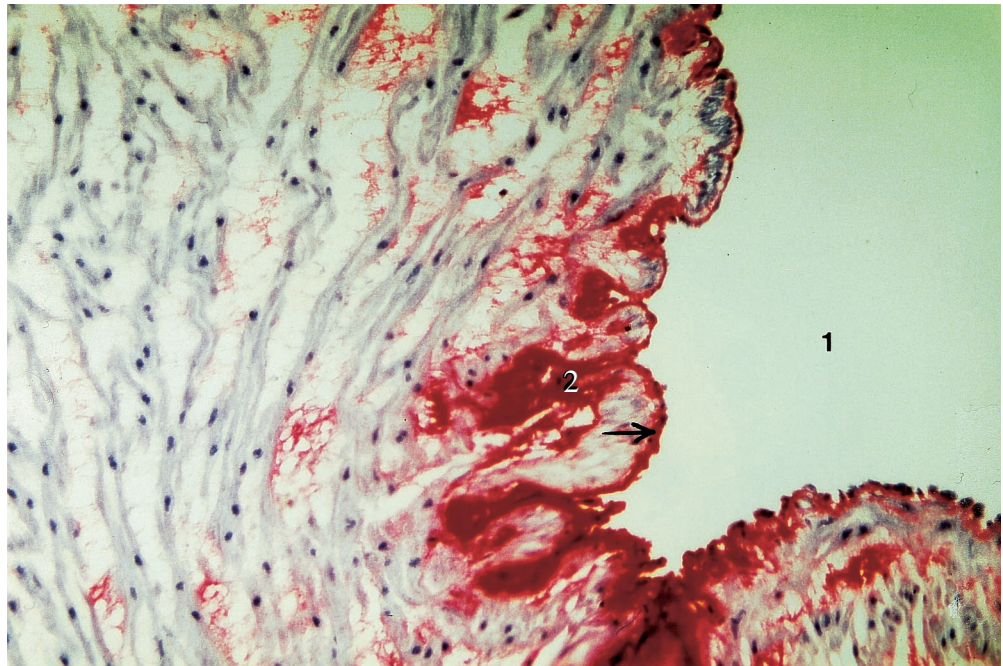


Abbildung 23 Immunfluoreszenznachweis des von Willebrand Faktors in einer HUVEC Kultur der 2. Passage. Der Sekundärantikörper war FITC konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)



- 1- Lumen der Vena umbilikalıs
 2- HUVEC (rote Anfärbung der lumenwärts gerichteten Zellschicht)

Abbildung 24 Paraffingewebeschnitt der Nabelschnur mit Nachweis des von Willebrand Faktors im Endothel (Pfeil). Die Färbung wurde mit LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 40-fach)

Endoglin

Des weiteren wurde der kürzlich von der Firma Dako isolierte, monoklonale Antikörper gegen Endoglin an beiden Zelltypen in Kultur angewendet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt. In den HUVEC Kulturen war das Antigen, wenn auch schwach, vorhanden (Abbildung 25). Seine genaue Lokalisation in der Zelle war nicht zu bestimmen, da die Färbung gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt war.

In der RPE Kultur konnte kein Endoglin nachgewiesen werden.

Bei der Anwendung des Antikörpers gegen Endoglin am Gewebeschnitt des Auges und der Nabelschnur zeigte das Endothel der Nabelschnurvene eine Anfärbung (Abbildung 26). Eine Bindung an das RPE im Augenpräparat wurde nicht festgestellt.

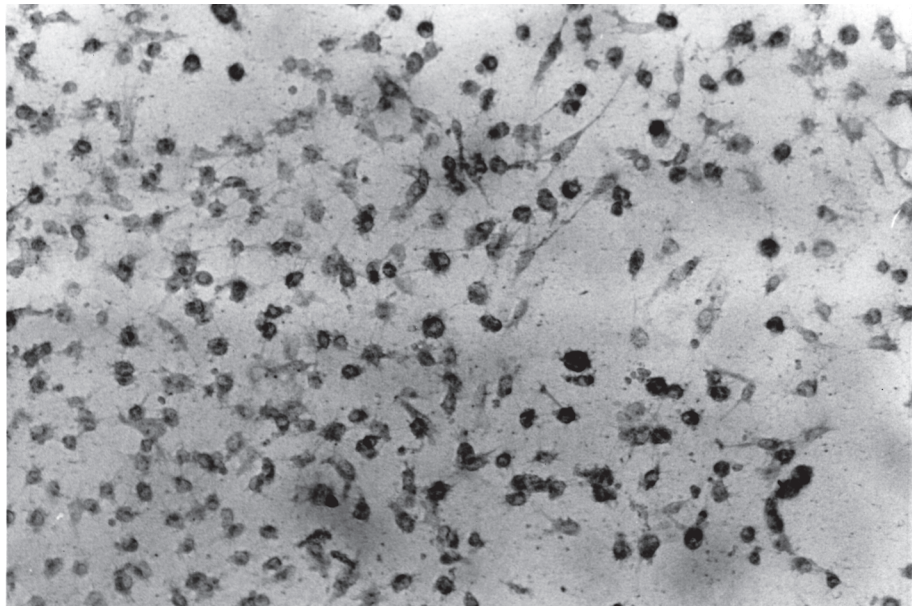
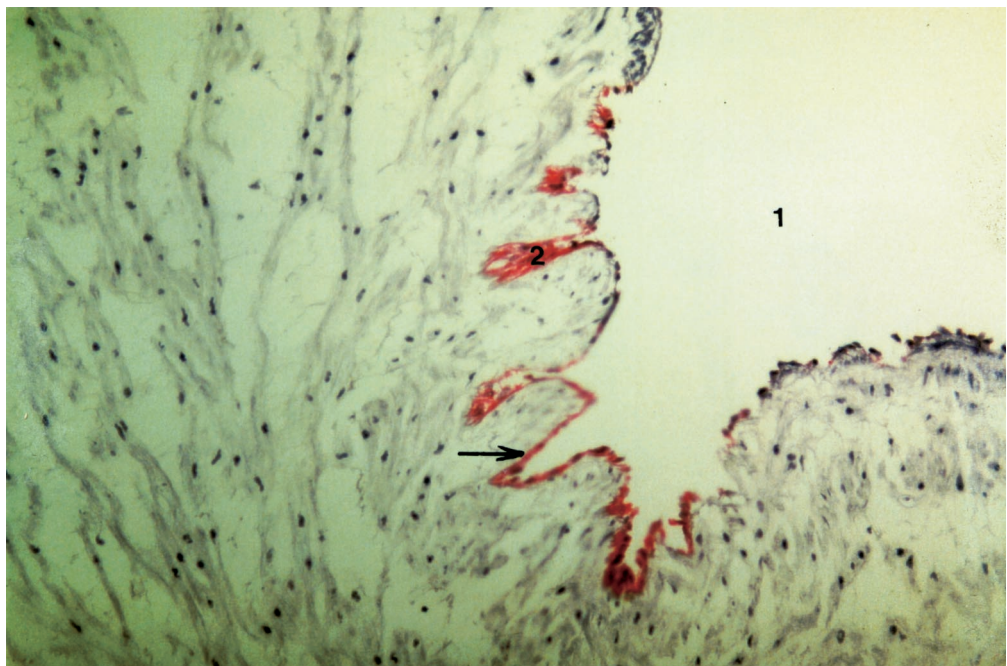


Abbildung 25 Immunologischer Nachweis von Endoglin in der Zellkultur der vaskulären Endothelzellen der 2. Passage, seit 20 Tagen kultiviert. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 100-fach)



1- Lumen der Vena umbilicalis
2- HUVEC (rote Anfärbung der lumenwärts gerichteten Zellschicht)

Abbildung 26 Gewebeschnitt der Nabelschnur, in dem Endoglin nachgewiesen wurde (Pfeil). Die Färbung wurde mit LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 20-fach)

CD 31

Unter Verwendung des Antikörpers CD 31 wurden die Kulturen der RPE Zellen und HUVEC miteinander verglichen. Der Nachweis des monoklonale Antikörpers CD 31 zeigte eine intensive Anfärbung des gesamten Zytoplasmas, unter Aussparung des Nukleus, in den kultivierten vaskulären Endothelzellen (Abbildung 27).

In der Zellkultur konnte keine Bindung des Antikörper gegen CD31 an RPE nachgewiesen werden.

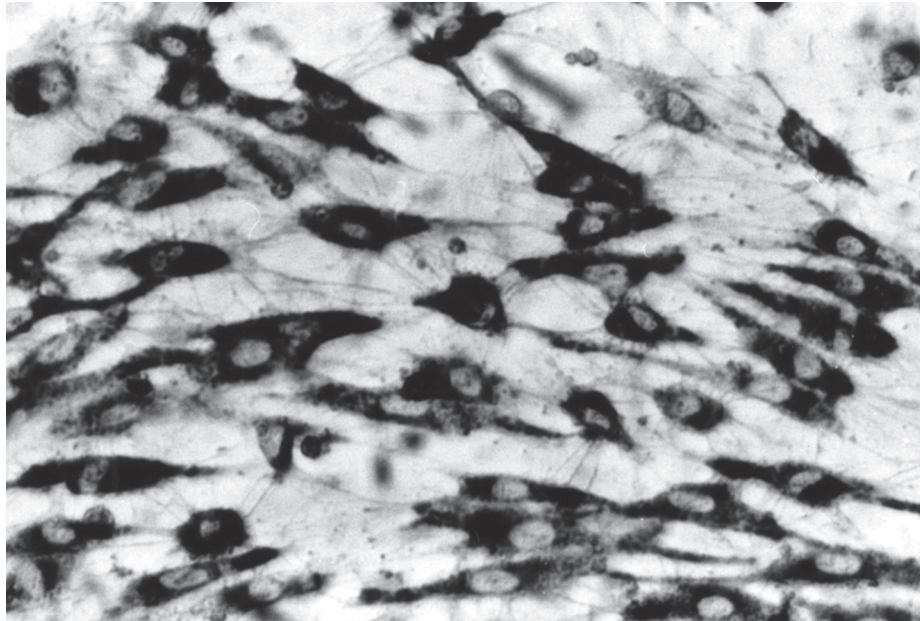


Abbildung 27 Immunologischer Nachweis von CD 31 in der Zellkultur von HUVEC in der 3. Passage. Es ist eine starke Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 320-fach)

Ulex europaeus

Der polyklonale Antikörper gegen Ulex europaeus Lektin reagierte in der Zellkultur mit den vaskulären Endothelzellen, nicht aber mit den RPE Zellen.

Bei der HUVEC Zellkultur zeigte sich eine starke, unregelmäßige Färbung des Zytoplasmas mit strahlenförmigen Ausläufern von den Zellen in den interzellularen Raum. Es gab Zellkernaussparungen aber auch komplette Anfärbungen von Zellen (Abbildung 28).

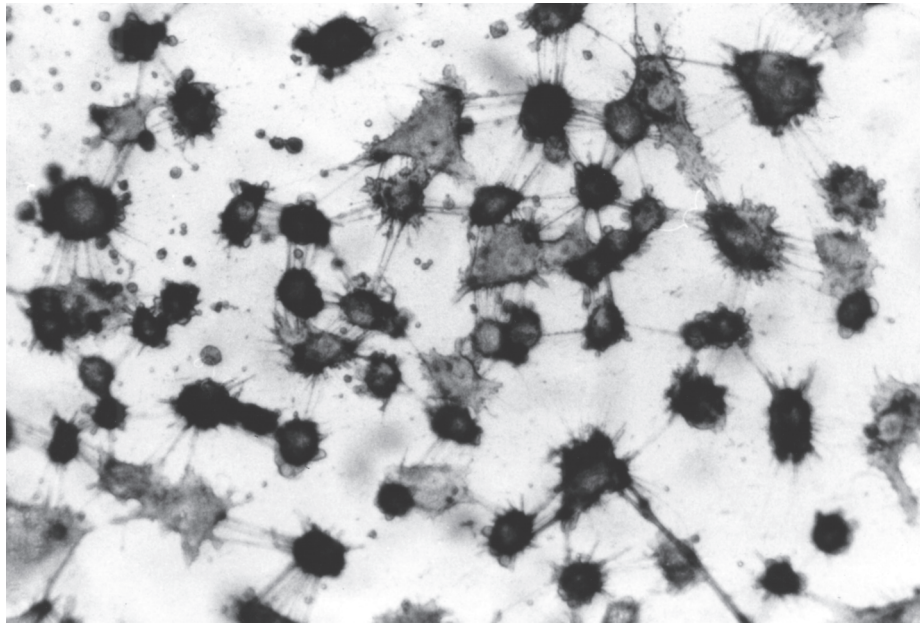


Abbildung 28 Immunologischer Nachweis von *Ulex europaeus* Lektin in kultivierten vaskulären Endothelzellen der 5. Passage. Der Primärantikörper war HRPO konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

Antithrombin III

Antithrombin III wurde sowohl in kultivierten RPE Zellen als auch in den vaskulären Endothelzellen gefunden.

Der Nachweis von Antithrombin III in der RPE Kultur zeigte eine unregelmäßige Anfärbung des Zellplasmas, teilweise unter fehlender Abgrenzung des Zellkernes. Des weiteren waren markierte Einschlüsse innerhalb der Zelle als auch außerhalb zu finden (Abbildung 29).

Bei den HUVEC färbte der polyklonale Antikörper den Zellrasen ungleichmäßig. Die Aussparung des Nukleus war gut vom inhomogen gefärbten Plasma abzugrenzen (Abbildung 30).

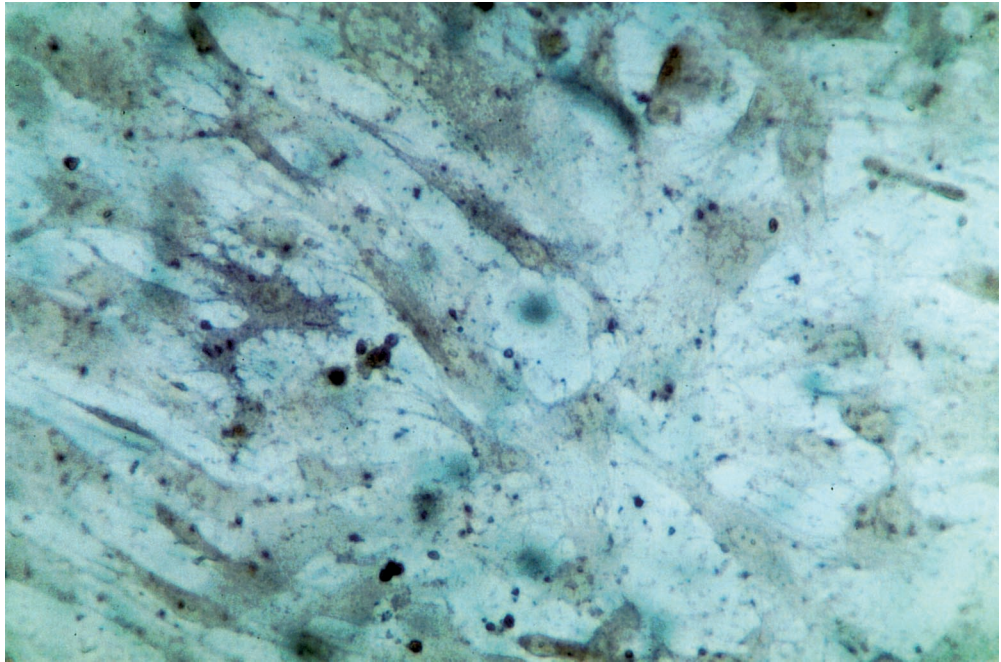


Abbildung 29 Immunologischer Nachweis von Antithrombin III (polyklonaler Antikörper) in der RPE Kultur der 3. Passage, subkonfluent gewachsen. Der Sekundärantikörper war mit AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)

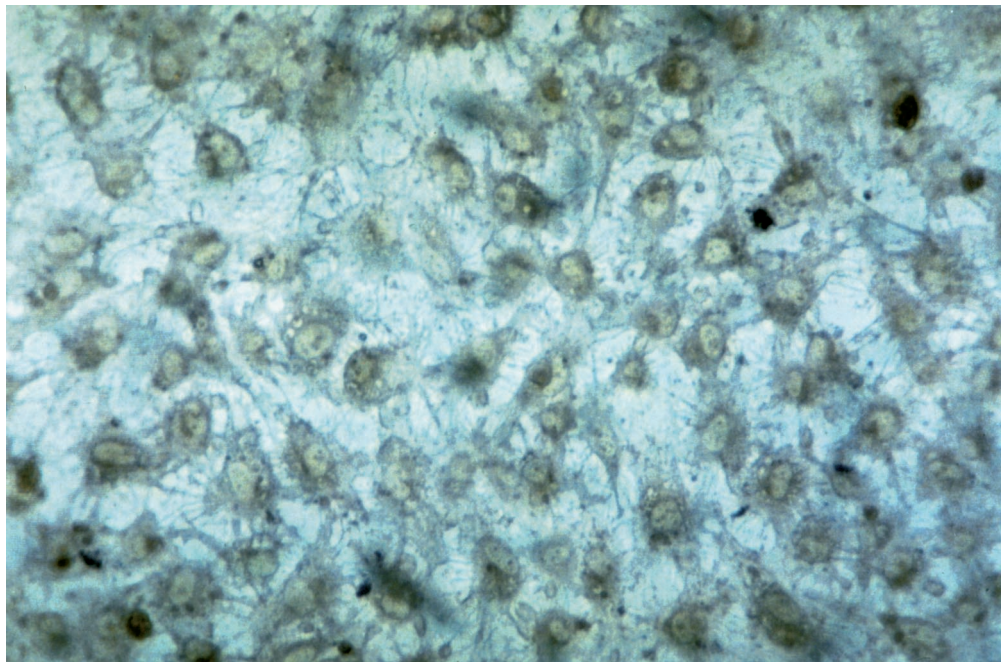


Abbildung 30 Immunologischer Nachweis von Antithrombin III bei HUVEC der 3. Passage, subkonfluent. Der Sekundärantikörper war mit AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)

3.2.3 Intermediäre Filamente

Intermediäre Filamente bestehen aus biochemisch und immunologisch unterscheidbaren Untereinheiten und bilden stabile, charakteristische Komponenten des Zytoskeletts.

In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorkommen folgender Komponenten bei den vaskulären Endothelzellen und retinalen Pigmentepithelzellen untersucht:

Zytokeratin 8

Zytokeratin 18

Zytokeratin 19

gemeinsames Epitop der Zytokeratine 1, 5, 10, 14

Vimentin

Zytokeratin 8

Der Nachweis von Zytokeratinen ist charakteristisch für Epithelzellen. Die Bindung des monoklonalen Antikörper gegen Zytokeratin 8 wurde in der RPE Kultur und am Gewebeschnitt des Auges nachgewiesen (Abbildung 31 und 31a). Bei den vaskulären Endothelzellen zeigte sich keine Anfärbung in der Zellkultur. Das Zytoskelett der RPE wies eine intensive, aber ungleichmäßige Färbung auf. Der Kern wurde nicht angefärbt.

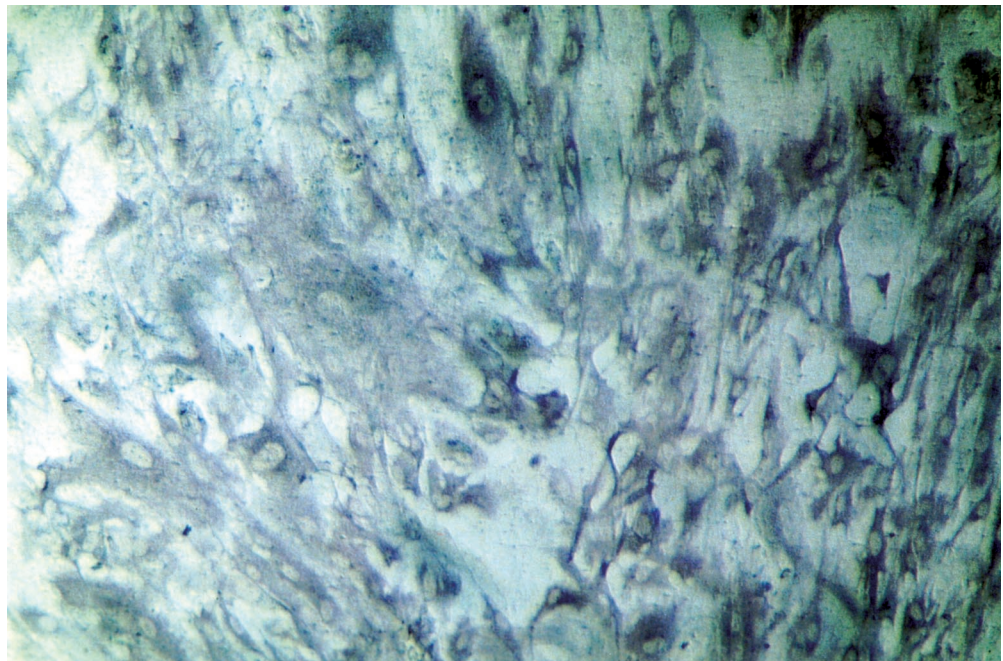


Abbildung 31 Immunologischer Nachweis von Zytokeratin 8 in kultivierten RPE Zellen der 5. Passage nach 10 Tagen Kultivierung. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)

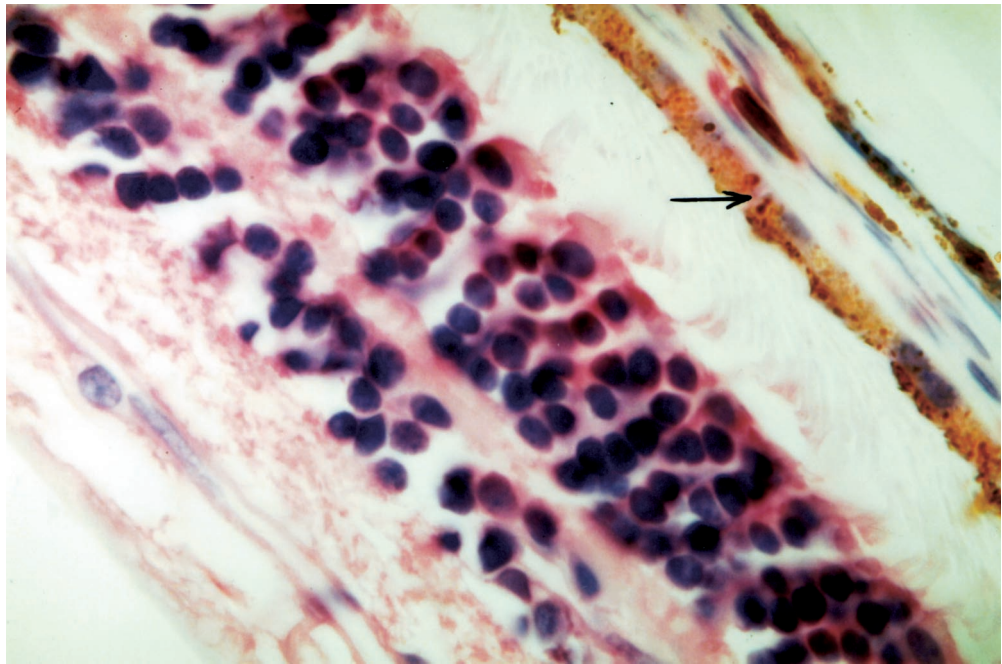


Abbildung 32 Gewebeschnitt des Auges, in dem Zytokeratin 8 im RPE (Pfeil) nachgewiesen wurde. Die Färbung wurde mit LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 100-fach)

Zytokeratin 18

Auch der Antikörper gegen das monoklonale Zytokeratin 18 konnte in den kultivierten RPE nachgewiesen werden. Die Anfärbung des Zytoplasmas war relativ schwach ausgeprägt und der Kern nicht mit einbezogen (Abbildung 33).

Bei der Untersuchung auf das Vorkommen von Zytokeratin 18 in der Zellkultur von vaskulären Endothelzellen konnte kein Nachweis erbracht werden.

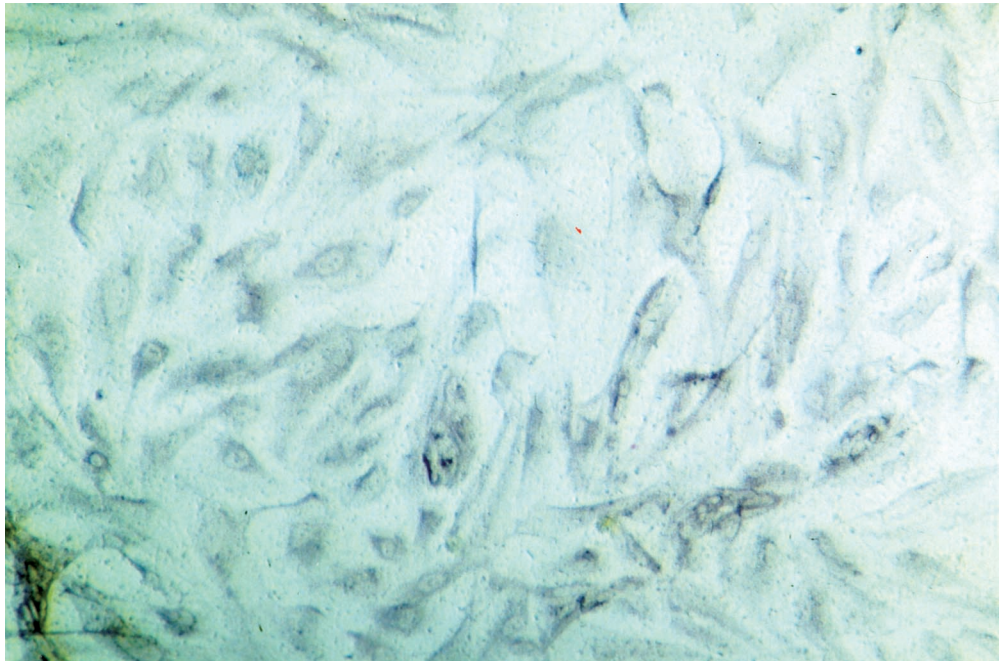


Abbildung 33 Immunologischer Nachweis von Zytokeratin 18 in einer Zellkultur von RPE, der 3. Passage. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

Zytokeratin 19

Eine Bindung an den Antikörper gegen das monoklonale Zytokeratin 19 wurde im RPE in vitro, nicht aber mit den vaskulären Endothelzellen nachgewiesen. Bei der RPE Kultur zeigte das Zellplasma eine unterschiedlich verteilte und dichte Anfärbung, unter Aussparung des Kernes (Abbildung 34). Der gesamte Zellrasen erschien ungleichmäßig gefärbt. Große Zellen wurden stärker angefärbt. Es war zu beobachten, daß mit Zunahme der Passagen und dem Auftreten großvolumiger Zellen die Färbung intensiver wurde.

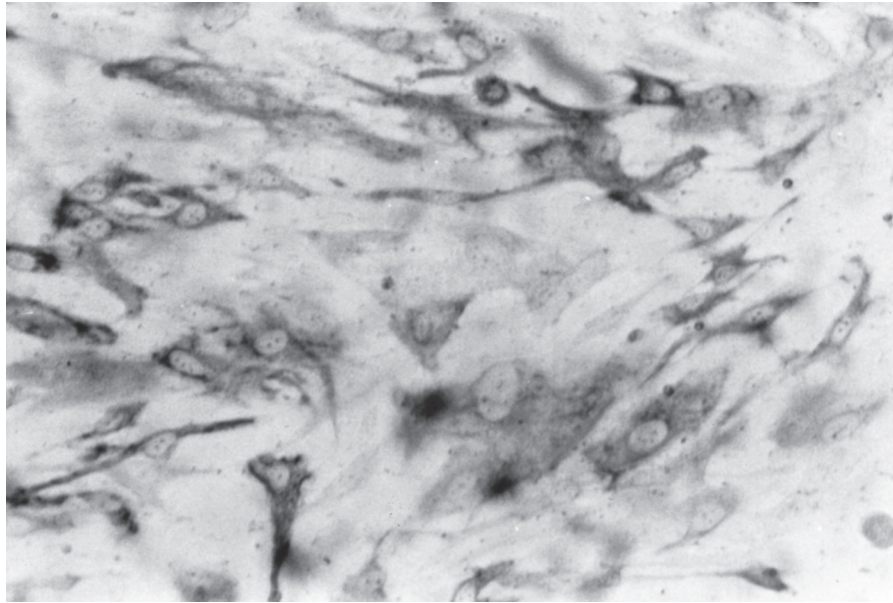


Abbildung 34 Immunologischer Nachweis von Zytokeratin 19 bei Zellen einer RPE Kultur der 5.Passage. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert.
(Vergrößerung 200-fach)

Gemeinsames Epitop der Zytokeratine 1, 5, 10 und 14

In der Kultur der retinalen Pigmentepithelzellen konnte eine Bindung des Antigens an das gemeinsame Epitop der Zytokeratine 1, 5, 10 und 14 nachgewiesen werden. Vorrangig große, teils polygonale Zellen mit zahlreichen Ausläufern wurden angefärbt (Abbildung 35). Diese makrophagenähnlichen Zellen zeigten eine komplette Zytoplasmaanfärbung mit Ausnahme des Zellkernes. Teile des Zellrasens waren nicht angefärbt und unterschieden sich durch die geringere Zellgröße von den gefärbten Arealen.

Bei den vaskulären Endothelzellen wurde das gemeinsame Epitop nicht exprimiert.

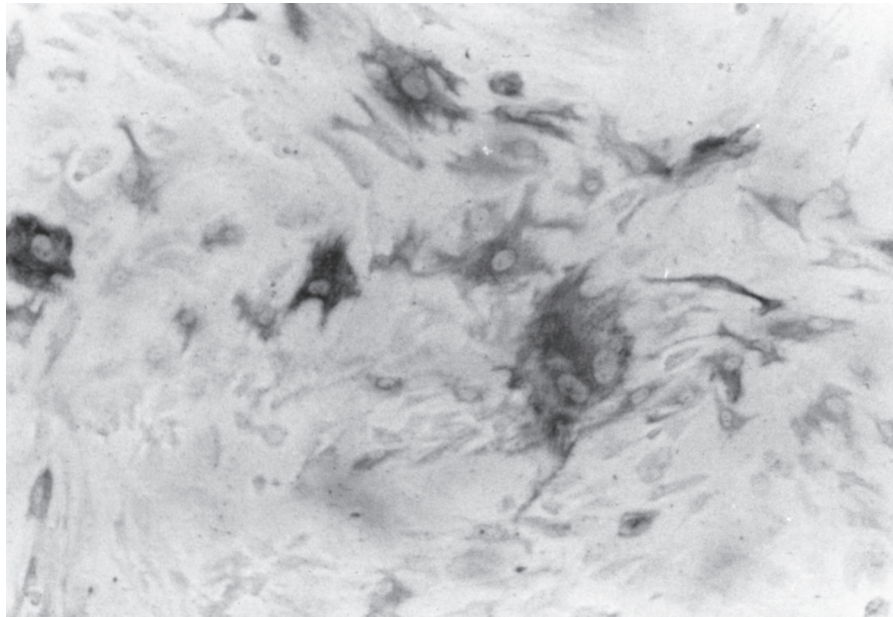


Abbildung 35 Immunologischer Nachweis von Zytokeratin 1,5,10,14 in retinalen Pigmentepithelzellen einer Kultur in der 2. Passage. Makrophagen-ähnliche Zellen zeigen komplette Anfärbung des Zytoplasmas. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

Vimentin

Das intermediäre Filament Vimentin wird normalerweise in nichtepithelialen Geweben exprimiert. Bei der Untersuchung wurde der polyklonale Antikörper angewendet, der sowohl in Zellkulturen der vaskulären Endothelzellen als auch im RPE das entsprechende Antigen band (Abbildungen 36 und 37). Das Ergebnis war bei allen Färbungen eindeutig in einer homogenen und starken Zytoplasmaanfärbung zu erkennen. Der Zellrasen war in allen Bereichen der Kulturfläche angefärbt und die Zellkonturen deutlich abgrenzbar.

Im Gewebeschnitt des Auges und der Nabelschnur konnte das Antigen nachgewiesen werden. Das RPE im Augenpräparat enthielt punktförmige Anfärbungen (Abbildung 38). Die Färbung der Nabelschnurvene war nicht nur auf das Endothel beschränkt und zeigte auch noch Bindung an die darunterliegenden Gewebsschichten (Abbildung 39).

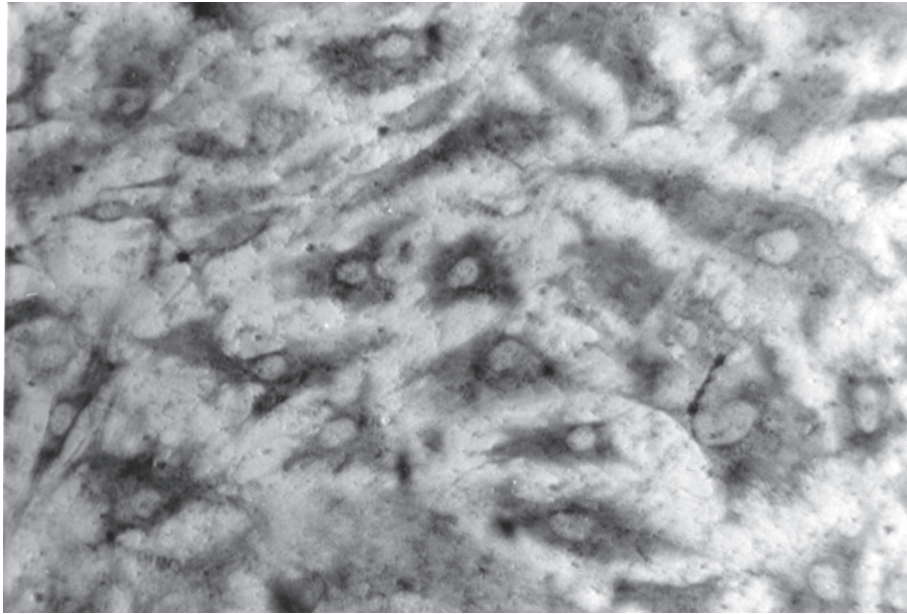


Abbildung 36 Immunologischer Nachweis von Vimentin in einer RPE Kultur der 3. Passage. Der Sekundärantikörper war AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

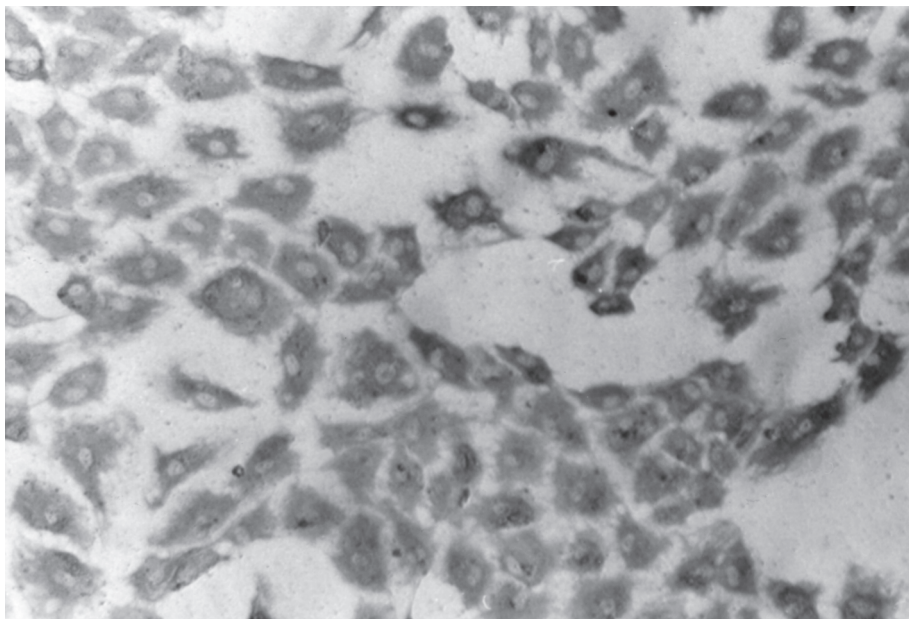
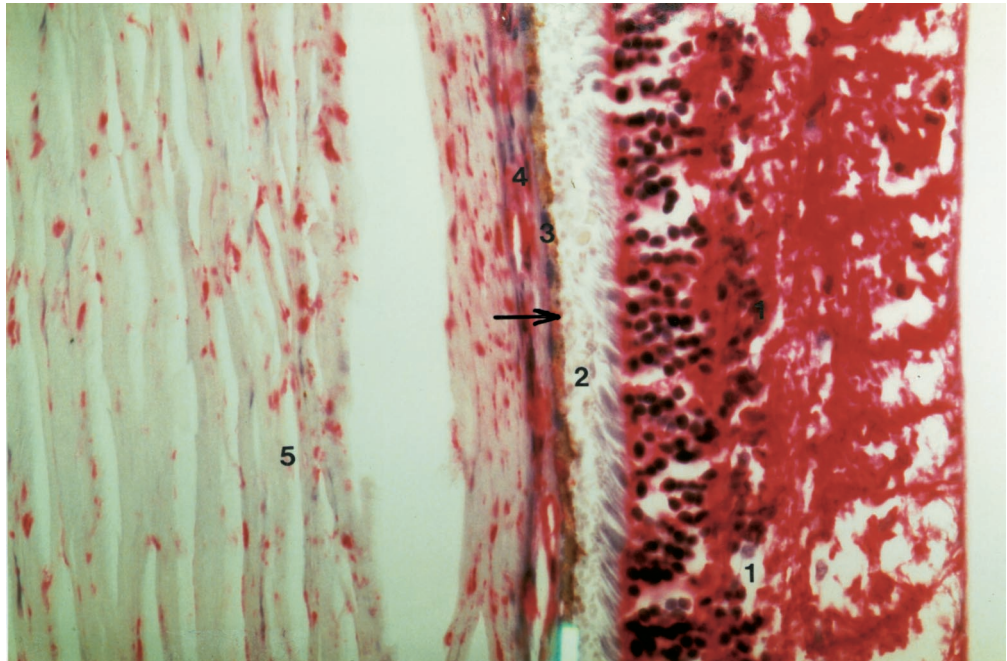
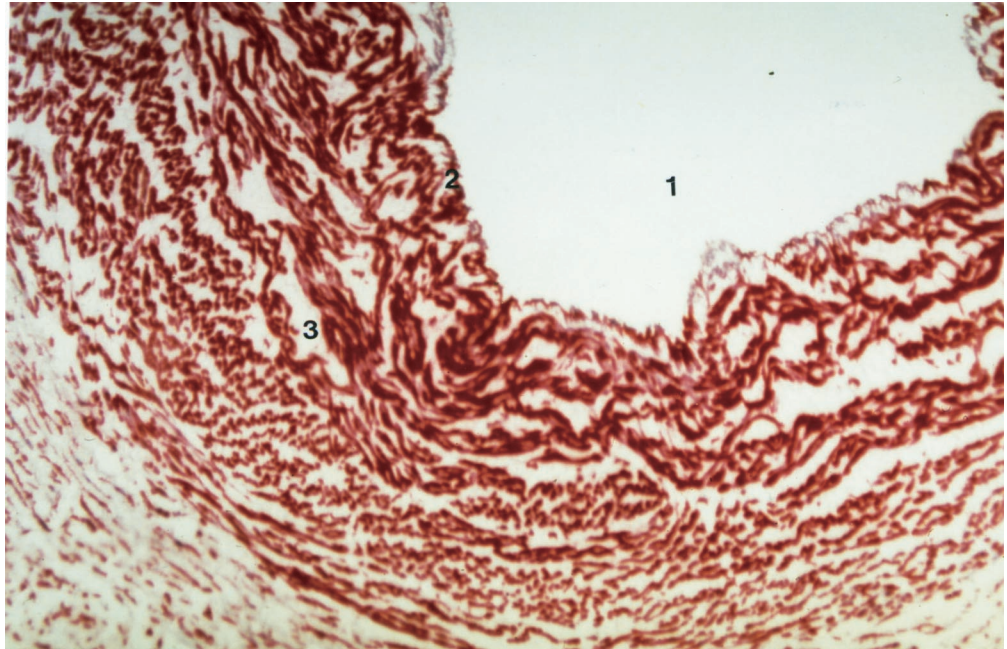


Abbildung 37 Immunologischer Nachweis von Vimentin in einer Kultur vaskulärer Endothelzellen der 4. Passage. Der Sekundärantikörper war AP markiert. (Vergrößerung 200-fach)



1- neurosensorische Retina, 2- Subretinaler Raum, 3- RPE und Bruch'sche Lamina, 4- Choriokapillaris, 5- Sklera

Abbildung 38 Gewebeschnitt des Auges mit dem Nachweis von Vimentin im RPE (Pfeil). Die Färbung wurde mit LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 40-fach)



1- Lumen der Vena umbilicalis, 2- HUVEC (einschichtig, lumenwärts), 3- Media und Adventitia

Abbildung 39 Gewebeschnitt der Nabelschnurvene, in dem Vimentin nachgewiesen wurde. Die Färbung wurde mit LSAB2-Kit durchgeführt. (Vergrößerung 20-fach)

3.2.4 NSE (Neuronen spezifische Enolase)

NSE ist ein neuroendokriner, neuroektodermaler Marker. Der verwendete Antikörper gegen NSE war gegen die gamma-Untereinheit der Enolase gerichtet, die hauptsächlich von Zellen neuronalen Ursprungs exprimiert wurde. Er zeigte keine Kreuzaktivität mit der alpha-oder beta-Untereinheit dieses Isoenzym. Es wurde ein mono- und polyklonaler Antikörper verwendet.

Der Nachweis mit dem polyklonalen Antikörper konnte in den Zellkulturen von RPE und HUVEC und in den Gewebeschnitten des Auges und der Nabelschnurvene erbracht werden.

Bei den RPE Zellkulturen war eine eindeutige Anfärbung des Zytoplasmas zu erkennen, die perinukleär betont war (Abbildung 40). Der Kern blieb ausgespart. Die Intensität der Färbung war von der Größe und dem Alter der Zellen abhängig. In Zellen früherer Passagen war die Färbung ausgeprägter, als in späteren. In den früheren Passagen zeigten insbesondere große, abgerundete Zellen (Makrophagen-ähnlich) eine intensive Bindung des Antikörpers.

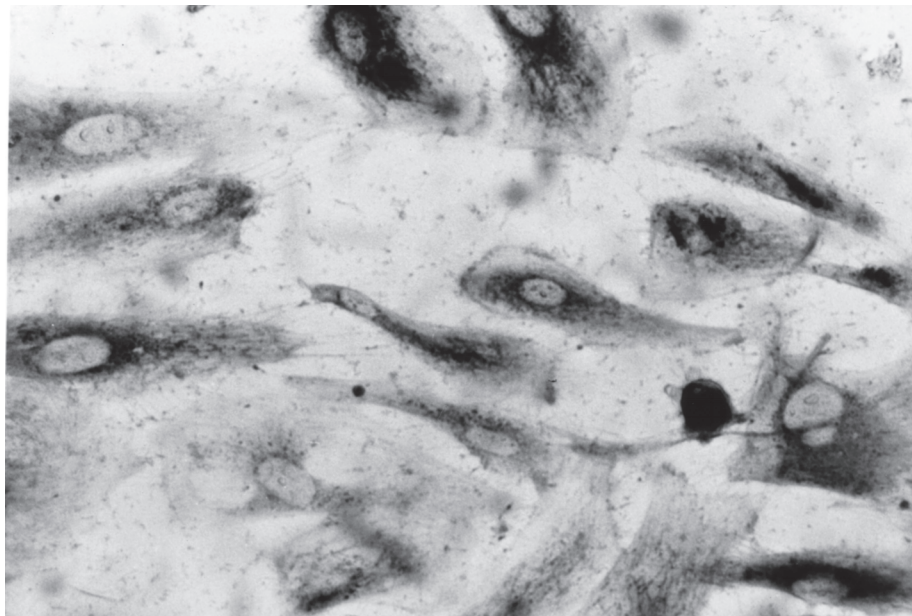


Abbildung 40 Immunologischer Nachweis von NSE (polyklonaler Antikörper) in kultivierten RPE Zellen der 4. Passage. Der Sekundärantikörper war mit AP konjugiert. (Vergrößerung 200-fach)

Bei seneszenten Zellen, mit weit ausgebreiteten Spindelzellen, kleinem Zellkern und langen Fortsetzen war das Zytoplasma nur noch schwach angefärbt (Abbildung 41).

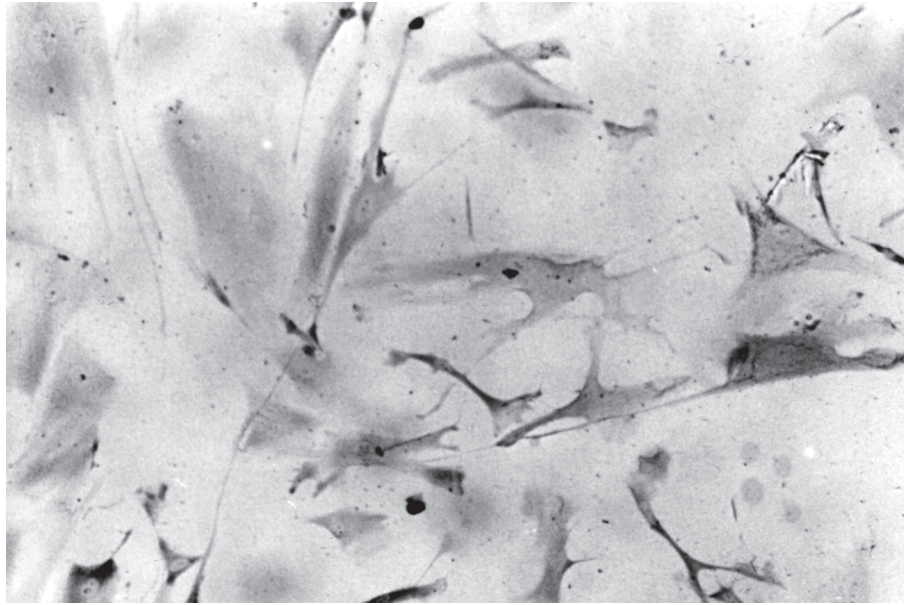
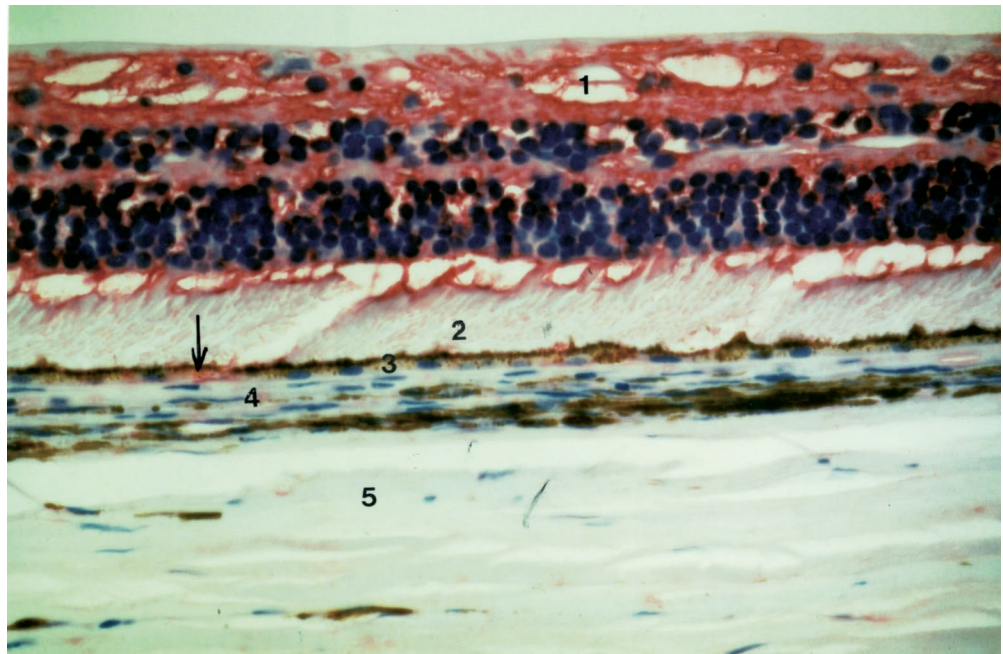


Abbildung 41 Immunologischer Nachweis von NSE (polyklonaler Antikörper) in einer RPE-Kultur der 6. Passage mit seneszenten Zellen.
Der Sekundärantikörper war mit AP konjugiert.
(Vergrößerung 200-fach)

Der Gewebeschnitt des Auges zeigt, daß der polyklonale Antikörper an das RPE und die neurosensorische Netzhaut band (Abbildung 42).

Im Gewebeschnitt der Nabelschnurvene wurde keine Anfärbung beobachtet.



Netzhautschichten des Auges:

- 1= neurosensorische Retina (1., 2., 3. Neuron)
- 2= subretinaler Raum
- 3= RPE + Bruchsche Lamina
- 4= Choriokapillaris +Lamina vasculosa choroideae
- 5=Sklera

Abbildung 42 Gewebeschnitt des Auges, an dem NSE (polyklonaler Antikörper) nachgewiesen wurde (Pfeil). Die Färbung erfolgte unter Anwendung von LSAB2-Kit der Firma Dako. (Vergrößerung 40-fach)

Bei den kultivierten HUVEC war ebenfalls ein Binden des polyklonalen Antikörper NSE nachweisbar (Abbildung 43). Die Anfärbung war schwächer und nicht auf bestimmte Strukturen in der Zelle zurückzuführen. Es scheint sich hierbei um eine unspezifische Bindung des neuroektodermalen Markers an mesodermale Zellen zu handeln, worauf in der Diskussion weiter eingegangen wird.

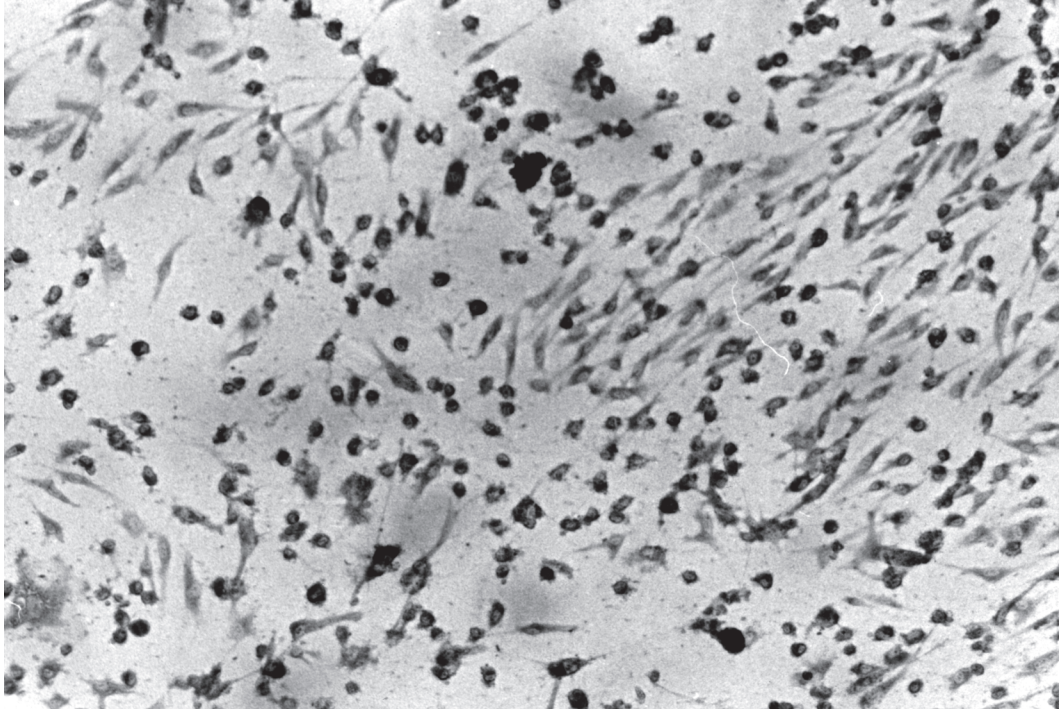


Abbildung 43 Immunologischer Nachweis von NSE (polyklonaler Antikörper) in der Zellkultur von vaskulären Endothelzellen.
Der Sekundärantikörper war mit AP markiert. (Vergrößerung 100-fach)

Ein Nachweis der Bindung des monoklonalen Antikörpers gegen NSE konnte weder in der Zellkultur noch am Gewebeschnitt für RPE und HUVEC erbracht werden.

3.2.5 Antikörper 9.3.E

Mit der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Bindung des monoklonalen Antikörpers 9.3.E an vaskuläre Endothelzellen der Nabelschnurvene und RPE Zellen nachgewiesen. Dabei wurde in Kulturen des retinalen Pigmentepithels ein sich änderndes Färbeverhalten gefunden.

So zeigte sich zum Zeitpunkt der Semikonfluenz eine starke Anfärbung der gesamten Zelle, einschließlich bzw insbesondere im Bereich des Zellkernes (Abbildung 44).

Mit Zunahme der Konfluenz blieb die starke Färbung im Zytoplasma der Zelle erhalten. Der Kernbereich erschien jedoch schwächer gefärbt und war nicht mehr eindeutig abgrenzbar (Abbildung 45). Eine weitere Beobachtung wurde bei einer seit 2 Wochen konfluent gewachsenen Kultur des

RPE gemacht, die nur eine Anfärbung im Bereich der Zellgrenzen aufwies (Abbildung 46). Es schien, als wenn die Expression des Antigens von der Wachstumsphase der RPE Zellen abhängig ist. So wurde bei den durchgeführten Färbungen beobachtet, daß bei Verwendung von RPE Zellen im semikonfluenten Stadium eine Färbung im Bereich der gesamten Zelle auftrat, während nach mehrtägiger Konfluenz die Färbeintensität abnimmt. Bei der antigen-präsentierenden Substanz handelt es sich um einen Bestandteile der Basalmembran, der während der Kultivierung offensichtlich unterschiedlich exprimiert wird.

Da der Antikörper 9.3.E nicht paraffingängig war, konnte keine Färbung am Gewebeschnitt durchgeführt werden.

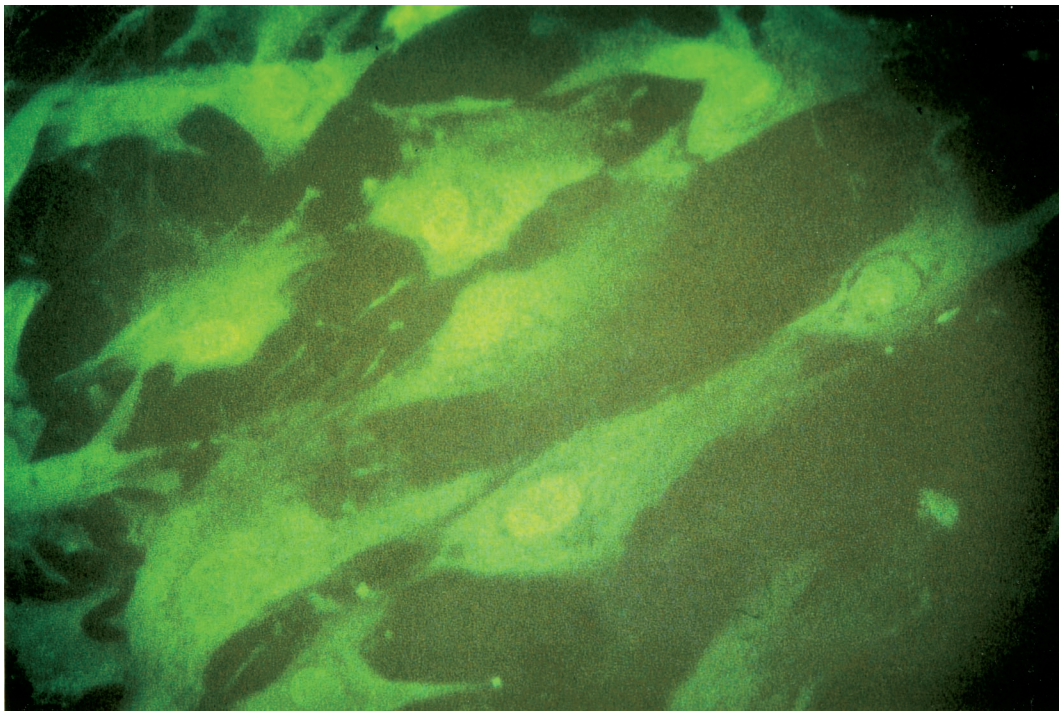


Abbildung 44 Immunfluoreszenznachweis von 9.3.E (monoklonaler Antikörper). Die semikonfluent gewachsenen RPE Zellen zeigen Anfärbungen der gesamten Zelle, insbesondere des Kernes.

Der Sekundärantikörper war mit FITC markiert. (Vergrößerung 320-fach)

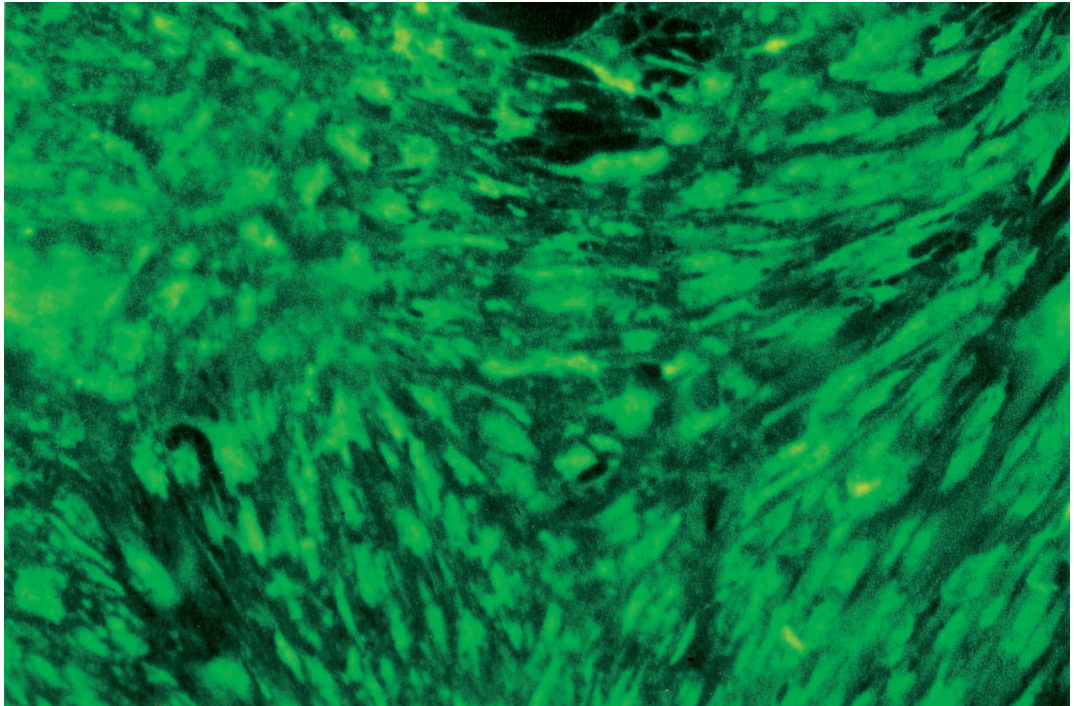


Abbildung 45 Immunfluoreszenznachweis von 9.3.E an konfluenter RPE Kultur der 3.Passage nach 4 Tagen. Das Zytoplasma zeigt starke Anfärbungen, der Kern ist nicht abgrenzbar. Der Sekundärantikörper war mit FITC markiert. (Vergrößerung 100-fach)

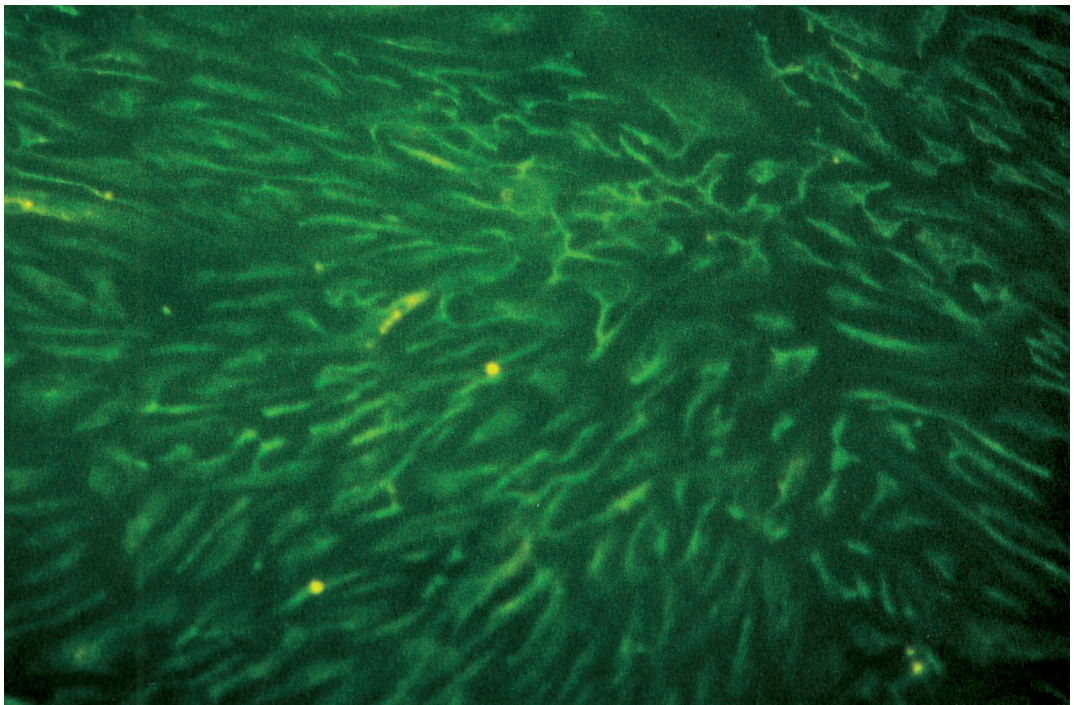


Abbildung 46 Immunfluoreszenznachweis von 9.3.E an seit 2 Wochen konfluent wachsender RPE Kultur der 2. Passage. Nur die Zellgrenzen sind markiert. Der Sekundärantikörper war mit FITC konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

Bei den vaskulären Endothelzellen zeigte sich eine intensive und gleichmäßige Anfärbung der gesamten Zelle ohne Differenzierung der einzelnen Zellbestandteile und unabhängig vom Wachstum und Konfluenzstadium (Abbildung 47).

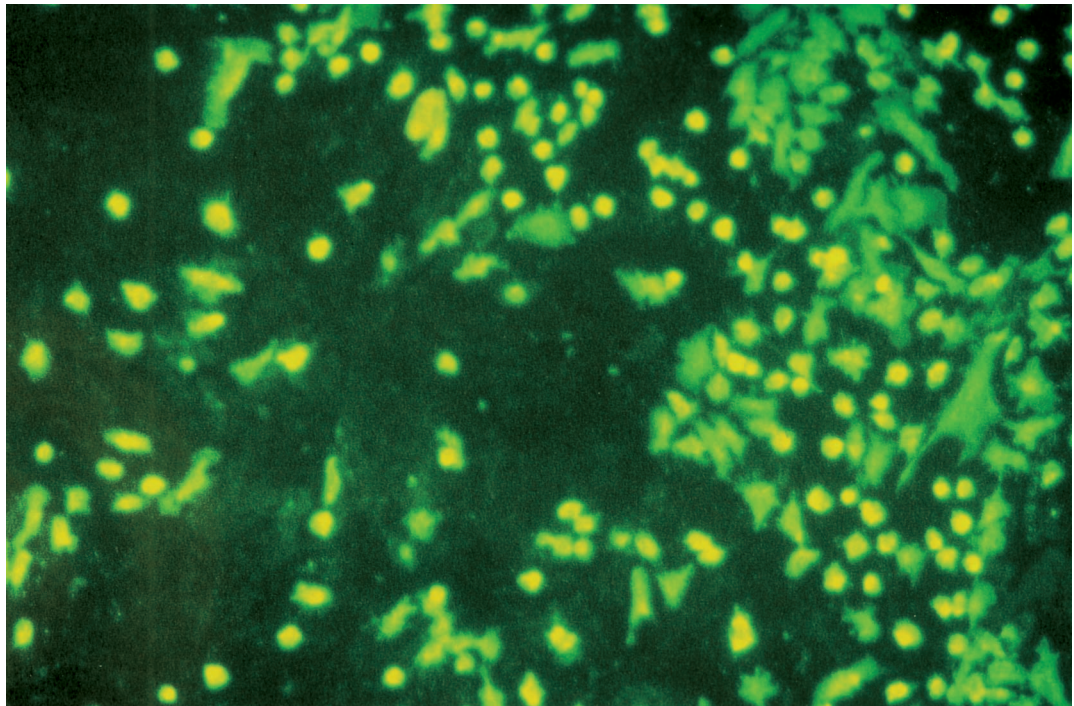


Abbildung 47 Immunfluoreszenznachweis von 9.3.E in der Zellkultur vaskulärer Endothelzellen. Der vor der Fixierung konfluente Monolayer war aufgrund von Fixierungsverlusten am Ende des Versuches nicht mehr vollständig. Der Sekundärantikörper war mit FITC konjugiert. (Vergrößerung 100-fach)

3.2.6 Zusammenfassung der Färbeergebnisse

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen an den Kulturen der vaskulären Endothelzellen und retinalen Pigmentepithelzellen zusammengefaßt.

Mittels spezifischer Antikörper wurde die Gegenwart (+) bzw. die Abwesenheit (-) von antigenen Determinanten der aufgeführten Proteine in den Zellen von HUVEC und RPE untersucht.

Tabelle 1

ANTIKÖRPER	RPE	HUVEC
Matrixkomponenten		
Fibronectin	+	+
Laminin	+	+
Kollagen IV	+	+
Zellassozierte Proteine		
von Willebrand Faktor	+	+
Endoglin	-	+
CD 31	-	+
Ulex europaeus Lektin	-	+
Antithrombin III	+	+
Intermediärfilamente		
Zytokeratin 8	+	-
Zytokeratin 18	+	-
Zytokeratin 19	+	-
Zytokeratin 1, 5, 10, 14	+	-
Vimentin	+	+
Neuroendokriner neuroektodermaler Marker		
NSE	+	+
Antikörper gegen HCEC		
9.3.E	+	+

3.3 Quantitativer immunhistochemischer Proteinnachweis

Der quantitative Proteinnachweis wurde an Zellextrakten der RPE und HUVEC Kulturen durchgeführt. Dafür wurde der Proteingehalt der 19 RPE- und 12 HUVEC Zellextrakte nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt, die zuvor in einem Potter homogenisiert wurden.

Bei den RPE Extrakten bewegte sich die Proteinkonzentration im Bereich von 0,55 mg/ml bis 4,4mg/ml, während sie bei den HUVEC Extrakten 0.8 mg/ml bis 4,0mg/ml betrug.

Die Methoden nach Bradford (1976) und Smith et al. (1985) führten zu keinen reproduzierbaren Ergebnissen, da der Extraktionspuffer mit Komponenten des Reaktionsgemisches reagierte.

Unsere Untersuchungen beinhalteten:

- Auftrennung der Proteine beider Zelltypenextrakte mit der SDS-Page und nachfolgender Silbernitratfärbung

- Nachweis der Matrixkomponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen IV nach der Methode des Western Blots

- Kinetische Untersuchung der Fibronectinbildung in Abhängigkeit von den Wachstumsstadien beider Zellarten

- Bindung des Antikörpers 9.3.E in HUVEC und RPE Kulturen und Bestimmung des Molekulargewichtes des erkannten Antigens nach dem Verfahren des Western Blots

Bei der SDS-Page liefen als Standard der LWM und der RM mit.

3.3.1 Silbernitratfärbung

Bei diesem Verfahren wurden im Anschluß an die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine beider Zelltypenextrakte die erhaltenen Banden nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1985) angefärbt.

Für die vaskulären Endothelzellen und die RPE Zellen konnte eine umfangreiche, scharf abgrenzbare Bandenverteilung der Molekülgröße von 14,4 kD bis 200 kD durch das Mitlaufen der Standardmarker RM und LWM erkannt werden (Abbildung 48). Die Verteilung der Proteinbanden war sehr ähnlich.

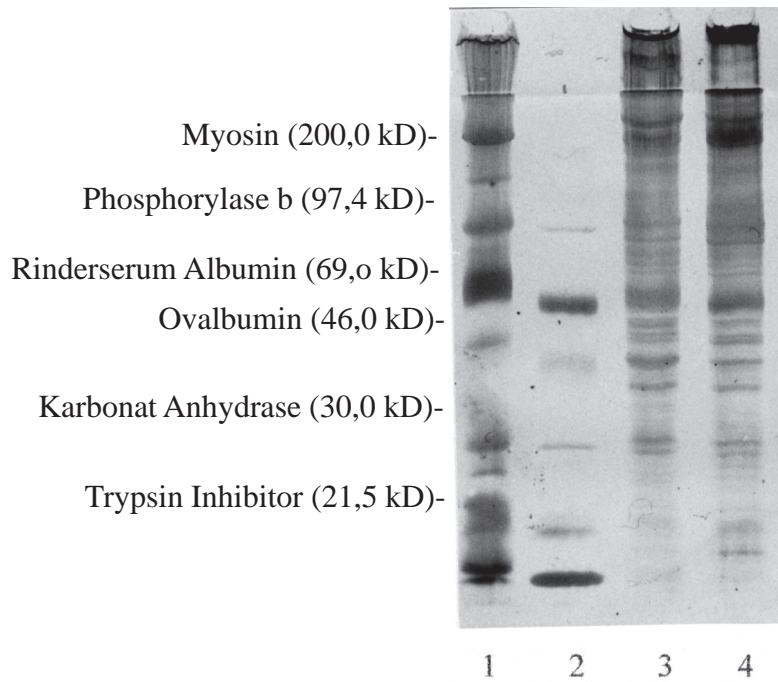


Abbildung 48 Silbernitratfärbung, die Proteinbandenverteilung der vaskulären Endothelzellen und RPE Zellen zeigt.

- 1=RM (Molekülgröße von 14,3-200 kD)
- 2=LWM (Molekülgröße von 14,4-94 kD)
- 3=RPE Zellextrakt
- 4=HUVEC Zellextrakt

3.3.2 Matrixkomponenten

Bei den RPE- und HUVEC Extrakten konnten die drei Matrixbestandteile Fibronectin, Laminin und Kollagen entsprechend ihrer Molekülgröße aufgetrennt und im anschließenden Immunoblotting angefärbt werden.

3.3.2.1 Fibronectin

Im Western Blot wurden beim Fibronectin Standard vier Banden nachgewiesen, drei deutlich abgrenzbare und eine darüber sehr dichte Bande im Bereich zwischen 100-200 kD (Abbildung 49). Die vaskulären Endothelzellen und RPE Zellen zeigten eine deutliche Bande bei 50 kD und eine nicht abzugrenzende Bande zwischen 100-200 kD.

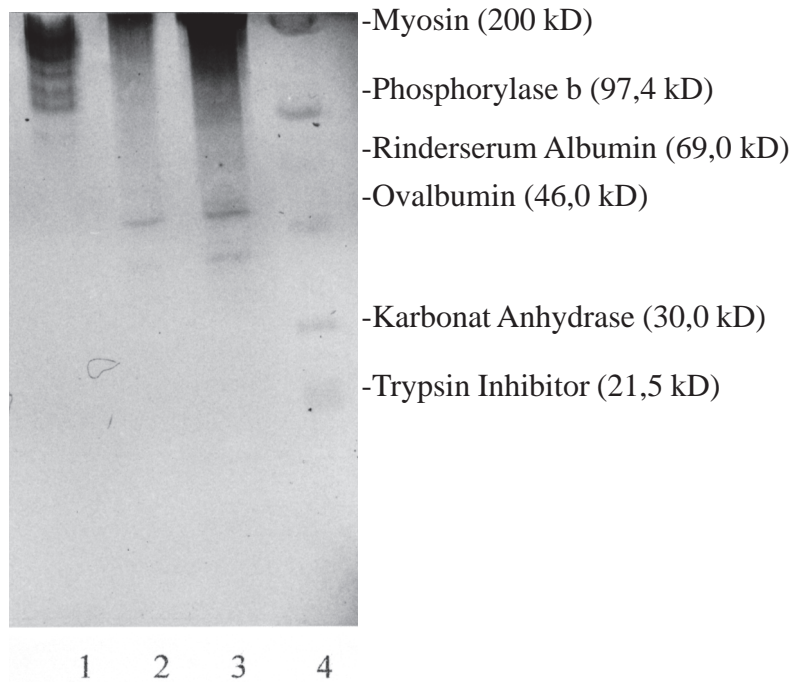


Abbildung 49 Western Blot mit Nachweis von Fibronektin in RPE und HUVEC Kulturen.
 1=Fibronektin Standard
 2=HUVEC Zellextrakt
 3=RPE Zellextrakt
 4=RM

3.3.2.2 Laminin

Beim Nachweis des monoklonalen Antikörpers gegen Laminin wurde im Immunoblot der RPE eine Bande im 50 kD Bereich angefärbt (Abbildung nicht dargestellt). Eine Bindung an die vaskulären Endothelzellen konnte hierbei nicht gezeigt werden.

Die Anwendung des polyklonalen Antikörpers wies bei beiden Zelltypen auf eine Markierung einer 50 kD Bande hin. Bei den RPE kam eine weitere Bande im Bereich von 30-46 kD dazu.

Der Laminin-Standard erkannte bei 100 kD eine schwache Bande, im Bereich von 200 kD eine Doppelbande.

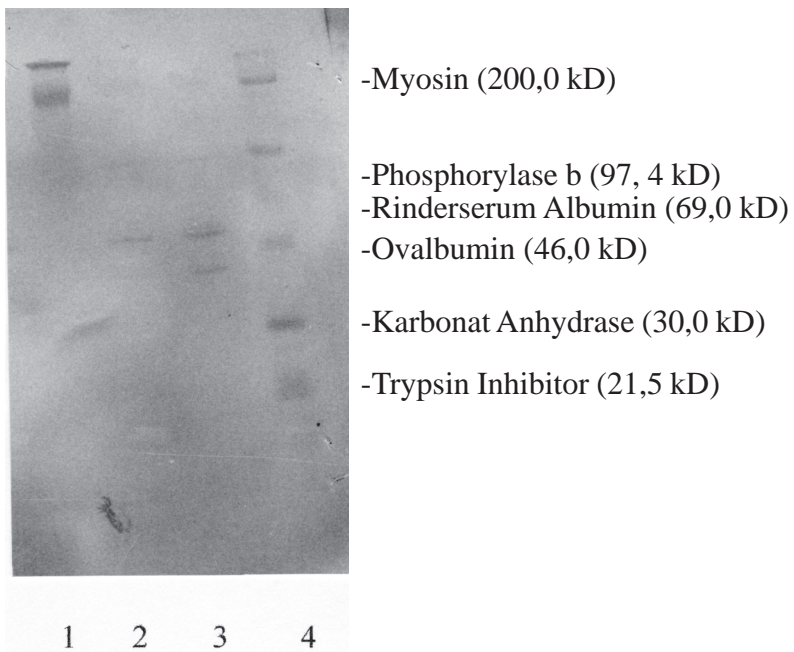


Abbildung 50 Immunoblot, bei dem Laminin (polyklonaler Antikörper) in RPE-und HUVEC Kulturen nachgewiesen wurde.

- 1=Laminin-Standard
- 2=HUVEC Zellextrakt
- 3=RPE Zellextrakt
- 4=RM

3.3.2.3 Kollagen IV

Im Western Blot ergab der Kollagen IV-Standard eine deutliche Bande bei 50 kD. In derselben Höhe wiesen die Zellextrakte der RPE und HUVEC ebenfalls Banden auf (Abbildung 51).

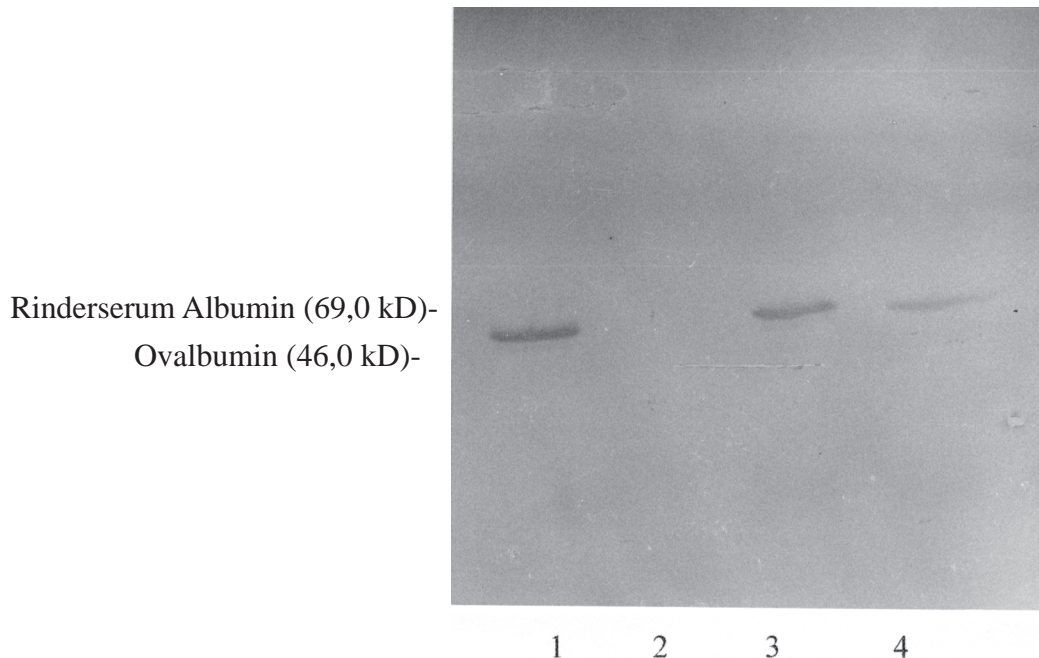


Abbildung 51 Western Blot mit Kollagen IV, welches in den RPE und HUVEC Zellen erkannt wurde.

- 1=Kollagen IV-Standard
- 2=RM (verblaßt)
- 3=HUVEC Zellextrakt
- 4=RPE Zellextrakt

3.3.3 Kinetik der Produktion der Matrixkomponente Fibronectin

Die zu untersuchenden vaskulären Endothelzellen und RPE wurden, wie in den Kapiteln 2.1 und 2.2 beschrieben, kultiviert und zu Zellextrakten, im Ergebnisteil 3.3.1 dargestellt, verarbeitet. Extrakte aus 19 RPE- und 12 HUVEC Kulturen standen für die kinetischen Untersuchungen zur Verfügung. Dabei wurden die Zellen entweder entsprechend ihres Wachstumsstadiums bzw. in Abhängigkeit von ihrem steigenden Passagealter auf die Produktion von Fibronectin nach dem Verfahren des Dot Blots quantitativ untersucht.

Die Herstellung der RPE und HUVEC Zellextrakte erfolgte von Kulturen eines Spenders aus unterschiedlichen Wachstumsstadien:

1. Zellextrakt- Zellen, deren Wachstum in Inseln begann
2. Zellextrakt- semikonfluenter Zellrasen
3. Zellextrakt- Subkonfluenz mit kleinen Löchern
4. Zellextrakt- Konfluenz der Zellkultur
5. Zellextrakt- Konfluenz seit 3 Tagen
6. Zellextrakt- Konfluenz seit 6 Tagen.

Auf diese Weise wurde Material für zwei Analysen bei den RPE Zellen und für eine Analyse bei den HUVEC zur Fibronectinbildung hergestellt.

Das Ergebnis zeigte eine Erhöhung der Fibronectinproduktion bei den vaskulären Endothelzellen und den RPE in Kultur mit zunehmender Konfluenz (Abbildungen 52 und 53). Dabei war die Färbeintensität bei den RPE Zellen stärker.

Weiterhin wurden beide Zelltypkulturen in Abhängigkeit von ihrem Passagealter untersucht. Hierbei wurde jeweils die gleiche Zelllinie verwendet. Nachdem die Zellen das Konfluenzstadium erreicht hatten, wurden sie noch 3 Tage in Kultur gehalten, bevor sie als Zellextrakt verarbeitet wurden. So besaßen die Zellen dieselbe Postkonfluenzdauer, aber eine unterschiedliche Passage. Die vaskulären Endothelzellen wiesen im Unterschied eine schneller erreichte Konfluenz auf, als die RPE in der Zellkultur. Auf diese Weise konnten sie früher subkultiviert und als Zellextrakt verarbeitet werden.

Für die altersabhängige Untersuchung standen zwei RPE Zellextraktserien und eine Zellextraktserie von den HUVEC zur Verfügung. Dabei kam es zu einem abweichenden Ergebnis beider Zelltypen voneinander. Während bei den RPE Zellen die Fibronectinbildung mit steigendem Passagealter zunahm (Abbildung 54), wies die Kinetik bei den HUVEC-Zellextrakten eine Abnahme auf (Abbildung 55).

Desweiteren konnte beim Vergleich der RPE Zellanalysen nach morphologischen und altersabhängigen Kriterien eine Zunahme der Färbeintensität mit dem Alter der Zellkulturen aufgezeigt werden.

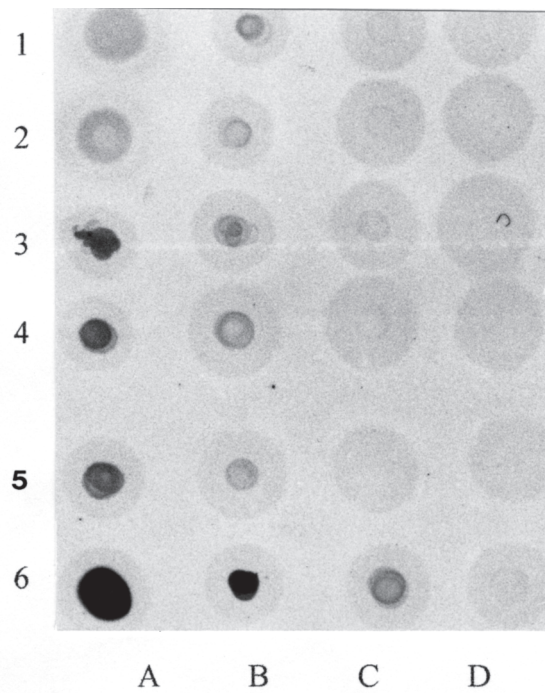


Abbildung 52 Ausschnitt aus dem Dot Blot mit Nachweis der Zunahme der Fibronectinbindung in Abhängigkeit von der Zelldichte bei den RPE. Es wurden 6 Extrakte einer Kultur der 4. Passage hergestellt. In Spalten erfolgt die Aufteilung der Verdünnungen der Proteinextrakte (Spalte A:1mg/ml, Spalte B:0,1mg/ml, Spalte C:0,01mg/ml, Spalte D:0,001mg/ml) von links nach rechts. Vertikal, von oben nach unten sind die Wachstumsstadien aufgetragen (Reihe 1: Zellen in Inseln , Reihe 2: Semikonfluenz, Reihe 3: Subkonfluenz, Reihe 4: Konfluenz, Reihe 5: Konfluenz seit 3 Tagen, Reihe 6: Konfluenz seit 6 Tagen)

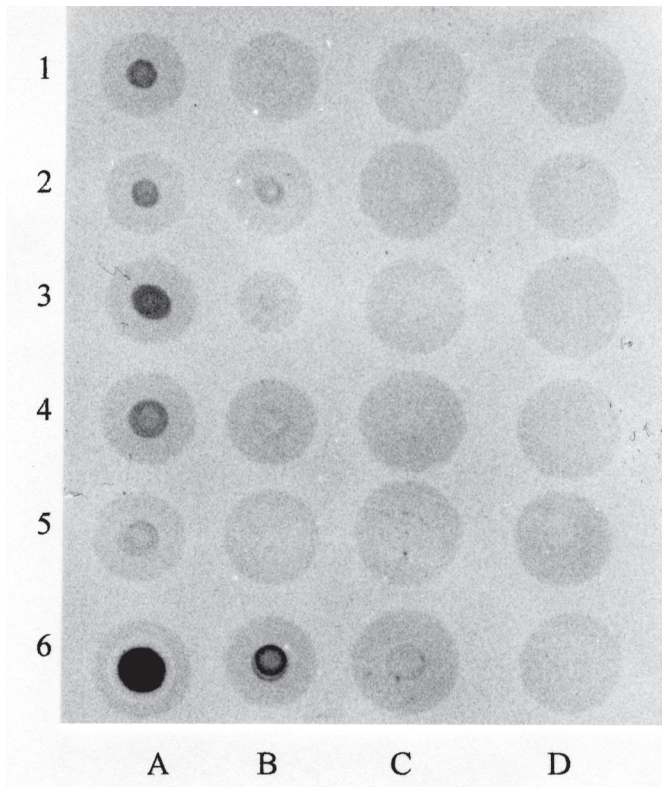


Abbildung 53 Dot Blot , in dem die Zunahme der Fibronektinbildung in Abhängigkeit von der Morphologie in der HUVEC Kultur nachgewiesen wurde. Dabei befanden sich die Zellen in der 5. Passage einer Kultur. Die Konfluenz nahm von oben nach unten zu (Reihe 1: in Inseln wachsend, Reihe 2: Semikonfluenz, Reihe 3: Subkonfluenz, Reihe 4: Konfluenz, Reihe 5: Konfluenz seit 3 Tagen, Reihe 6: Konfluenz seit 6 Tagen)
Die Verdünnungsreihe entsprach 4 Spalten , von links nach rechts verlaufend (Spalte A: 1mg/ml, Spalte B: 0,1mg/ml, Spalte C: 0,01mg/ml, Spalte D: 0,001mg/ml)

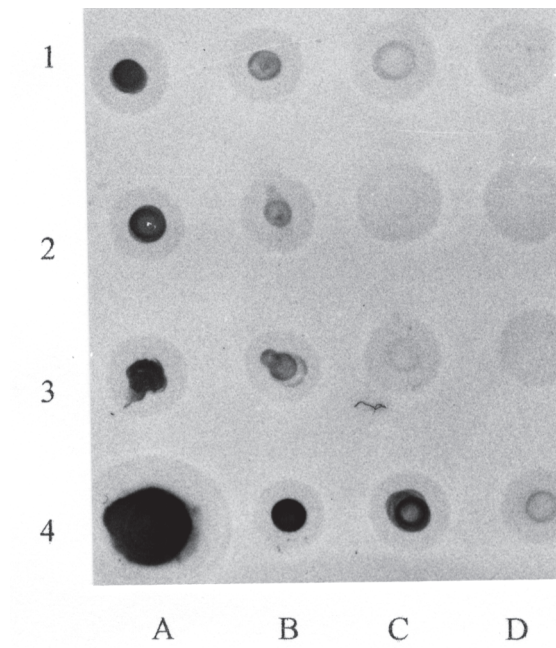


Abbildung 54 Dot Blot, der die Zunahme des Fibronektins in RPE Zellen der fortlaufenden Passage darstellt. In 4 Reihen sind die Passagen 2-5 von oben nach unten aufgetragen (Reihe 1: 2. Passage, Reihe 2: 3. Passage, Reihe 3: 4. Passage, Reihe 4: 5. Passage) . Die 4 Spalten von links nach rechts beinhalten die Verdünnung (Spalte A: 1mg/ml, Spalte B: 0,1mg/ml, Spalte C: 0,01mg/ml, Spalte D: 0,001mg/ml)

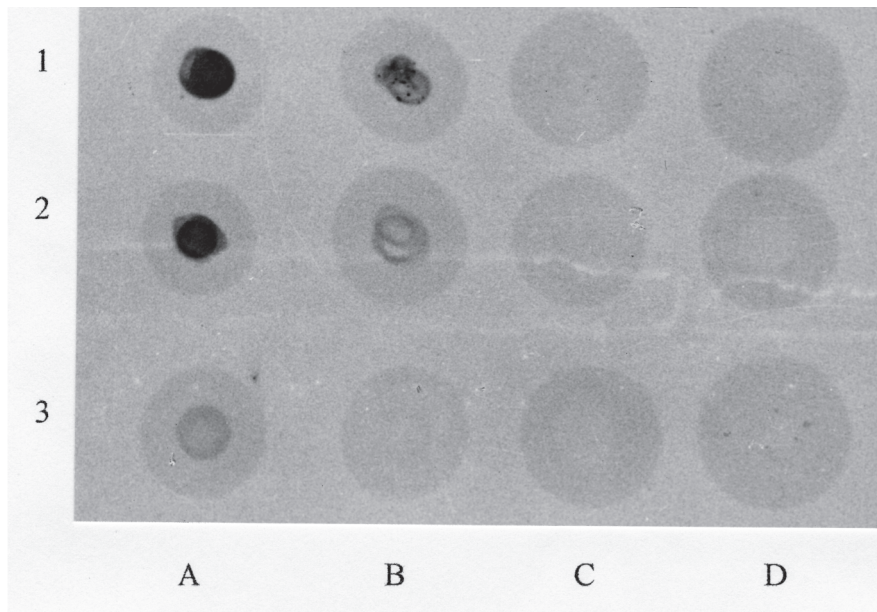


Abbildung 55 Dot Blot, der eine Abnahme der Fibronektinproduktion in vaskulären Endothelzellen von der 1. bis zur 5. Passage darstellt. In absteigender Reihe sind die Passagen 1, 3 und 5 abgebildet (Reihe 1: 1. Passage, Reihe 2: 3. Passage, Reihe 3: 5. Passage). Die Spalten 1-4 zeigen horizontal die Verdünnungskonzentrationen der Proteinextrakte an (Spalte A: 1mg/ml, Spalte B: 0,1mg/ml, Spalte C: 0,01mg/ml, Spalte D: 0,001mg/ml)

3.3.4 Antikörper 9.3.E

Der monoklonale Antikörper 9.3.E erkannte im Western Blot eine 130 kD Bande, nachdem die Proteine von RPE und HUVEC Zellkulturextrakten aufgetrennt wurden (Abbildung 56).

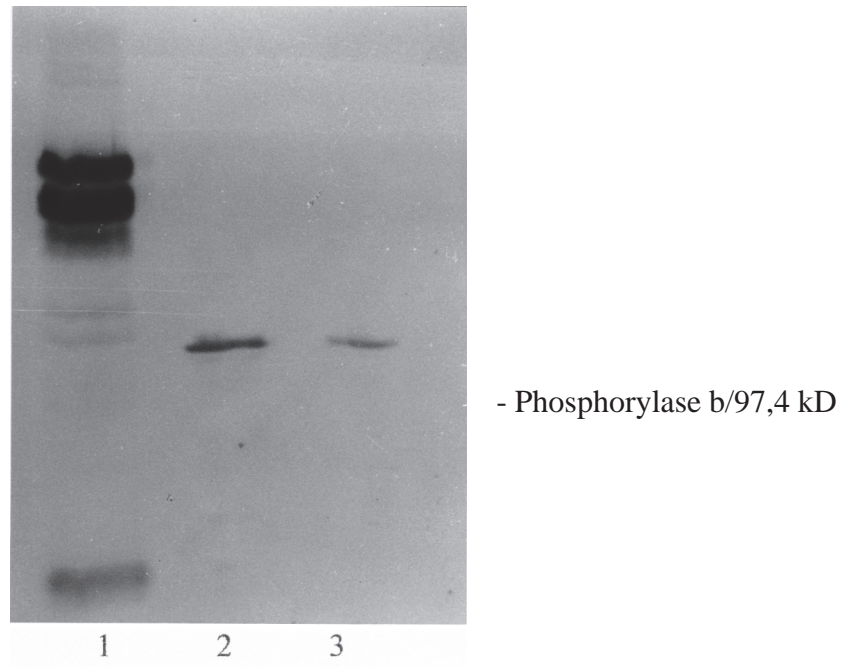


Abbildung 56 Western Blot vom Antikörper 9.3.E, der ein 130 kD Protein in RPE und HUVEC Zellen erkannte.

1=Antikörper 9.3.E

2=RPE Zellextrakt

3=HUVEC Zellextrakt

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Isolierung

Es wurde eine im Labor etablierte Isolierungstechnik nach Sobottka Ventura et al. (1996) verwendet, bei der ein Gemisch aus Kollagenase I und IV, in einem Verhältnis von 1:1 Anwendung fand. Dieses Gemisch war dem Trypsin, nach der Methode von Baumgartner et al. (1992) hinsichtlich der initialen Zellzahl und der Vitalität der Zellen (Sobottka Ventura et al., 1996) überlegen. Aus diesem Grunde fand die Kollagenase in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Bei unseren Untersuchungen wurden die RPE Zellen in einem Zeitraum von 2-95 Stunden post mortem erfolgreich isoliert.

Zur Verbesserung der Kulturbedingungen wurde Uvea-konditioniertes Medium verwendet, welches Mitogene wie bFGF (Schweigerer et al., 1987), PDGF (Campochiaro et al., 1989) und VEGF (Adamis et al., 1993) beinhaltet. Diese Faktoren fungieren als Wachstumsfaktor und Chemoattractant für das RPE und sind an der Zelldifferenzierung beteiligt.

Für die vorliegende Arbeit wurden als Vergleich zum RPE vaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene herangezogen. Diese wurden aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit gewählt und weil eine Reihe charakteristischer Endothelzellmarker existieren. Es sind verschiedene Arbeiten zur Isolierung der HUVEC (Maruyama, Pomerat und Slick, 1963, Pollak und Kasai, 1964, Fryer et al., 1966 und Jarmolych et al., 1968) beschrieben. Erst Jaffe et al. (1973a) konnten sie auch als Endothelzellen identifizieren. Als Nachweis für Endothelzellen wird der vWF verwendet, der in speziellen Organellen der Endothelzellen (Jaffe et al. 1973b), den Weibel-Palade-Körperchen (Weibel und Palade, 1964) gebildet wird und dort elektronenmikroskopisch sichtbar ist. Die vaskulären Endothelzellen für diese Untersuchungen wurden nach der von Gimbrone et al. (1978) beschriebenen und durch Friedl et al. (1989) modifizierten Methode mit einer 0,05%igen Trypsinlösung isoliert.

Nach den Untersuchungen von Friedl et al. (1989) kann eine erfolgreiche Isolierung zwischen 8-36 Stunden post partum durchgeführt werden. Bei der Untersuchung war eine Zellisolierung nur bis 15 Stunden nach Geburt erfolgreich.

4.1.2 Kultivierung und Morphologie

Die Kultivierung der RPE Zellen und HUVEC erfolgte jeweils nach etablierten Methoden und bereitete keine Probleme bei der Durchführung.

Die für die Durchführung dieser Arbeit angelegten Zellkulturen der Epithel- und Endothelzellen wiesen entsprechende morphologische Charakteristika auf, die in der Literatur beschrieben und im Folgenden nochmals vergleichend gegenübergestellt werden.

Das RPE zeigte in der Primärkultur einen Monolayer aus hexagonalen bis ovalen Zellen, die eine Kopfsteinpflaster-ähnliche Konfiguration aufwiesen. Die Zellen waren pigmenthaltig und die Bildung eines konfluenten Monolayers dauerte 8-10 Tage.

Bei der Subkultivierung kam es zu Veränderungen hinsichtlich der Form und ihres Pigmentgehaltes. Die RPE Zellen verloren im Laufe der Subkultivierung ihre epitheloide Form und wurden fibroblastoid. Ab der 1. Passage war in den Zellen kein Pigment mehr nachweisbar.

Ab der 7. Passage zeigen die Zellen Zeichen der Hautalterung. Die Seneszenz äußerte sich neben einem Absinken der Zelldichte auch durch Veränderungen in der Morphologie. So nahmen die Zellen teilweise um ein Vielfaches ihres Volumens zu und bildeten in zunehmendem Maße Vakuolen.

Die HUVEC zeigten in der Zellkultur ebenfalls eine kopfsteinpflasterartige Morphologie. Die Zellen waren gleichmäßig groß, hexagonal und im Vergleich kleiner als die RPE. Ihre Generationszeit betrug ca. 24 Stunden. Damit war ihre Proliferationsrate im Vergleich zum RPE höher. Im Verlauf der Subkultivierung wurden die Zellen etwas größer, die Form der Zellen änderte sich dabei nur geringfügig und kann nicht als fibroblastoid bezeichnet werden. Degenerationserscheinungen konnten ab der 7. Passage beobachtet werden

4.1.3 Identifizierung beider Zellarten

Für die Analyse des RPE und der HUVEC wurden ergänzend zur morphologischen Beurteilung immunhistochemische Zellmarker verwendet, um die RPE Zellen und HUVEC zunächst zu identifizieren und im Anschluß vergleichend zu charakterisieren. Für RPE Zellen ist bisher kein käuflicher, zuverlässiger und eindeutiger antigener Marker bekannt, so daß ihre Charakterisierung *in vitro* bisher auf die Ausbildung der typischen Morphologie beruhte. Als Epithelzellen exprimieren RPE Zellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Zytokeratine. Dieses kann als Nachweis einer Reinkultur gelten, da mögliche verunreinigende Zelltypen, wie Gliazellen, Müllersche Zellen, Fibrozyten, Melanozyten, Endothelzellen und Perizyten Zytokeratin negativ sind (Lazarides, 1980). In der Literatur sind weitere spezifische Zellmarker zur Identifizierung des RPE in der Zellkultur beschrieben. So kann adultes RPE mit einem Antikörper gegen das membran Antigen RET-PE2 (Greenwood et al., 1996) von retinalen Zellen unterschieden werden. Auch der Antikörper gegen RPE 65, einer Komponente des retinol-bindenden-Proteins (RBP), erkennt spezifisch RPE. Die Funktion des Antigens ist unbekannt. Hamel et al. (1993) isolierte das Protein aus der mikrosomalen Membran des RPE.

Als spezifischer Marker für pränatale und infantile RPE findet der Anti Melanoma Antikörper HMB 45 Anwendung., während Anti-HMB 50 speziell adulte humane und bovine RPE erkennt (Zhao et al., 1997).

Allen diesen Zellmarkern ist gemeinsam, daß sie nicht käuflich zu erwerben sind und daher in dieser Arbeit keine Anwendung fanden.

Im Unterschied dazu ist der spezifische RPE-Zellmarker CRALBP (cellular retinaldehyde binding protein) kommerziell erhältlich. Das Antigen zeigt aber eine veränderte Expression durch den Einfluß von Wachstumsfaktoren und der ECM (Champocharo und Hackett, 1993). CRALBP wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und könnte Gegenstand weiterer Studien sein.

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an den HUVEC wurde als Nachweis für ihre Identität überprüft, ob sie vWF synthetisieren. Dabei zeigte sich, daß sich der Nachweis des vWF nur bedingt zur Charakterisierung eignet, da er nur in Endothelzellen großer Gefäße nachweisbar ist, nicht aber in denen aus Kapillaren (Little et al., 1986, Millard et al., 1987, Turner et al., 1987). Die Antikörper gegen CD 31 und Endoglin schienen zum eindeutigen Nachweis von vaskulären Endothelzellen besser geeignet zu sein. Bei CD 31 handelt es sich um ein membrangebundenes Glykoprotein. Endoglin ist ein endotheliales Glykoprotein, welches an der Zellproliferation, ECM-Synthese und Adhäsionsvorgängen beteiligt ist. Um das Spektrum der Endothelmarker zu komplettieren, wurde das Ulex europaeus Agglutinin I (UEA I) und das Antithrombin III in den Endothelzellen nachgewiesen.

Unter Anwendung dieser immunhistochemischen Marker wurden Unterschiede zwischen RPE und HUVEC festgestellt, auf die in den Kapiteln 4.2.2 eingegangen wird und es wurden Unterschiede in deren Expression nachgewiesen (siehe Kapitel 4.2.3).

4.1.4 Immunhistochemische Färbungen *in vitro* und *in vivo*

Die Grundlage für immunhistochemische Färbungen ist die Antigen - Antikörperreaktion. Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine, die als Antwort auf den Kontakt mit dem Antigen gebildet werden. Antikörper, die für immunhistochemische Färbungen eingesetzt werden, sind hauptsächlich vom Typ IgG. Man unterscheidet polyklonale und monoklonale Antikörper. Polyklonale Antikörper werden von verschiedenen B-Lymphozyten gebildet und sind immunochemisch unterschiedlich. Sie reagieren mit verschiedenen Epitopen des Antigens. Federspiel et al. (1987) stellte fest, daß polyklonale Antikörper die Reaktivität auf ein Antigen verändern. Sie können kreuzreagieren und so die Sensitivität der Methode mindern.

Die monoklonalen Antikörper hingegen werden von einem B-Lymphozytenklon gebildet. Sie reagieren nur mit einem spezifischen Epitop, gegen das sie gerichtet sind.

Bei den Untersuchungen auf das Vorkommen der Markerproteine wurden immunhistochemische Färbungen mit mono- und polyklonalen Antikörpern in der Zellkultur dreimal durchgeführt. Dabei wurden Zellen verwendet, die aus unterschiedlichen Spenderaugen und Nabelschnüren isoliert wurden. Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden die Färbungen wiederholt. So konnte ausgeschlossen werden, daß es sich um einmalige Ergebnisse handelte. Für Gewebeschnitte standen ein Auge und eine Nabelschnur zur Verfügung.

Bei den Färbungen wurde immer eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt, da die Intensität der Färbungen in den verschiedenen Durchgängen der Untersuchungen variierte und Fehler so abgeglichen werden konnten. Als Färbeverfahren fanden die Immunoperoxidase und die Immunfluoreszenz Anwendung. Die Empfindlichkeit der Immunfluoreszenz war im Vergleich zur Peroxidase-Technik weitaus geringer, da ein Fluoreszenzmolekül nur Licht bestimmter Wellenlänge abgeben kann. Mit Peroxidase kann eine stärkere Färbung erzielt werden. Zum Nachweis der Antikörper an den Gewebeschnitten wurde die LSAB 2 Methode der Firma Dako eingesetzt. Für einige Komponenten wurden die an den Zellkulturen erhaltenen Ergebnisse an den Gewebeschnitten des Auges und der Nabelschnur bestätigt. Der Nachweis konnte jedoch nicht in jedem Falle erbracht werden.

Eine Bindung der Antikörper konnte durch den Pigmentgehalt der RPE Zellen in einigen Fällen nicht sicher lichtmikroskopisch nachgewiesen werden, da das Pigment die Farbreaktion des Antikörpers überdeckte.

Fehlerquellen bei der Durchführung können eine Überfixierung durch Formalin sein, die das Antigen zerstören kann (Hsu et al. 1981), oder eine ungenügende Formalinfixierung, die die Diffusion von Antigen ins Gewebe begünstigt und so eine starke Hintergrundfärbung erzeugt. Aber auch das Austrocknen der Schnitte zwischen den einzelnen Färbeschritten kann zu Hintergrundfärbung führen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die ECM darf nicht als inaktives Gerüst angesehen werden, das lediglich Zellen stabilisiert. Sie dient als aktive Unterstützung, kann Wachstumsfaktoren und Hormone binden und damit die Zellen permanent stimulieren. Auch die Morphologie, Migration, Proliferation und Differenzierung der Zellen ist ganz wesentlich von den Matrixbestandteilen abhängig. Ununterbrochen werden Matrixmoleküle von den Zellen modifiziert, abgebaut und resynthetisiert.

Als Zellen, die eine Basalmembran besitzen, sind die RPE Zellen fähig, eine extrazelluläre Matrix auszubilden, die sich unter anderem aus Laminin, Fibronectin und Kollagen IV zusammensetzt (Campochiaro et al., 1986). In der vorliegenden Studie wurden das Vorkommen dieser Matrixkomponenten im retinalen Pigmentepithel und in den vaskulären Endothelzellen immunhistochemisch untersucht. Im RPE konnte der Nachweis dieser Matrixkomponenten erbracht werden, den bereits Campochiaro et al. (1986) erfolgreich untersuchten. Kohn et al. (1995) wies die Komponenten in den HUVEC nach und wir konnten seine Ergebnisse bestätigen.

Der Nachweis von Laminin zeigte ein sehr feines fibrilläres Muster (Campochiaro et al. 1986). Laminin ist ein großes und multifunktionelles Glykoprotein. Es besteht aus drei Untereinheiten, die eine Kette A mit 400 kD und zwei Ketten B1 und B2 mit 200 kD beinhalten (Chung et al., 1979,

Timpl et al., 1979). Die Förderung verschiedener biologischer Aktivitäten sind dem Laminin zugeschrieben, wie Zellanheftung, Wachstum, Differenzierung, Zellpolarität und Neuritenwachstum (Timpl, 1989, End und Engel, 1991). Turksen et al. (1984) fanden bereits an kultivierten RPE Zellen des Huhns heraus, daß die Zellen Laminin synthetisieren, auf diesem Matrixbestandteil wachsen und ihren differenzierten Status beibehalten.

Die ECM Proteine, so auch Laminin, werden durch eine Vielzahl von Zellrezeptoren erkannt, wovon die Integrine bisher am besten studiert wurden (Albelda und Buck, 1990, Hynes 1992,). Mecham (1991) konnte bisher 6 Integrine nachweisen, die an Laminin binden. Die Interaktionen, an den Laminin beteiligt ist, sind nicht nur auf den extrazellulären Raum begrenzt, sondern breiten sich auch durch zelluläre Rezeptoren auf das Zytoskelett der Zellen aus. Desweiteren vermittelt Laminin eine zelluläre Anheftung an Kollagen IV (Terranova et al., 1980), welches ebenfalls als Bestandteil der ECM des RPE gefunden wurde. Es wurde erkannt, daß die Synthese von Kollagen für das Wachstum der RPE Zellen auf Plastiktitertplatten notwendig ist (Liotta et al., 1978).

Kollagen IV ist ein Bestandteil der Basalmembran im RPE von Hühnern (Turksen et al., 1984), von Katzen (Li et al., 1984) und des Menschen (Campochiaro et al., 1986) und bildet ein zweidimensionales Netzwerk. Es besteht aus zwei Ketten, $\alpha 1$ und $\alpha 2$, die zu einer Tripelhelix $\alpha 1 \times 2(\alpha 2)$ verbunden sind. Kollagen IV hat adhäsive Eigenschaften, ist am Wachstum beteiligt und bewirkt eine epitheloide Morphologie der Zellen. Es fördert die Differenzierung der Zellen und inhibiert ihr invasives Verhalten in vivo (Docherty et al. 1987, Dutt et al. 1991).

Fibronectin zeichnet sich durch eine Affinität zu Zelloberflächen aus, insbesondere zu Fibroblasten. Aber auch vaskuläre Endothelzellen (Sorgente et al., 1982) und das RPE (Campochiaro et al., 1986) werden durch Fibronectin angezogen. Es ermöglicht die Adhäsion an Proteoglykanbestandteile der Basalmembran (Ruoslahti et al., 1981) und wirkt chemotaktisch auf das RPE (Campochiaro et al., 1984). In der Zellkultur des RPE zeigt Fibronectin einen wachstumsstimulierenden Effekt und ist an der Veränderung der Zellen zu Fibroblasten-ähnlicher Morphologie beteiligt (Zhao et al., 1997). Untersuchungen ergaben, daß die RPE Zellen bereits nach drei Tagen in Kultur erste Fibronectinbildung, nach sechs Tagen eine eindeutige und nach neun Tagen eine intensive Ablagerung von Fibronectin zeigten (Campochiaro et al., 1986). Diese Ergebnisse konnten wir bei unseren Untersuchungen bestätigen. Campochiaro et al. (1986) konnte außerdem zeigen, daß die ECM-Produktion mit zunehmender Kultivierungsdauer steigt. Im Falle des Fibronectins konnte dieser Zusammenhang in unseren Ergebnissen auch quantitativ dargestellt werden. Bei unseren Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß die Produktion von Fibronectin mit dem Konfluenzstadium und dem Passagealter der RPE Zellen zunahm. Bei den vaskulären Endothelzellen nahm die gebildete Menge von Fibronectin mit dem Konfluenzstadium ebenfalls zu, in Abhängigkeit vom Passagealter nahm sie jedoch ab.

Der Vergleich der quantitativen Untersuchungen ergab, daß in den Western Blots der Zellextrakte andere Molekulargewichte gefunden wurden als bei den Standards. Dieses veränderte Laufverhalten könnte auf kovalent gebundene Moleküle zurückzuführen sein.

4.2.2 Zellassozierte Proteine

Es sind zahlreiche Antikörper bekannt, die an HUVEC binden und damit diesen Zelltyp charakterisieren.

In unserer Studie standen Antikörper gegen die Endothelzellmarker vWF, Ulex europaeus Lektin I, Antithrombin III, CD 31 und Endoglin zur Verfügung.

Bei den Untersuchungen konnte eine Bindung der Antikörper an die aufgeführten Endothelmarker in der Zellkultur und teilweise auch an Gewebeschnitten der Nabelschnur gezeigt werden.

vWF ist ein adhäsives Glykoprotein, das aus unterschiedlich geformten Multimeren von 0,5-20000 kD besteht (Mukai et al., 1980), in Endothelien synthetisiert wird (Shearn et al., 1977) und auch in geringer Menge in Thrombozyten (Rand et al., 1980) und Megakaryozyten vorkommt.

HUVEC Zellen enthalten Weibel-Palade-Körperchen, die eine Größe von 0,1 bis 3µm haben und zytoplasmatische Einschlüsse darstellen (Jaffe, 1977). Diese synthetisieren, speichern und setzen vWF ins Plasma frei (Wagner et al. 1982).

Lektine sind Proteine von Pflanzen oder Tieren, die spezielle Saccharidreste von Glykoproteinen und Glykolipiden binden. Ulex europaeus Lektin I (UEA I), ein Lektin, das man aus dem Ginster gewinnt, zeigt eine spezifische Affinität zu L-Fukose und Fukosyl-Resten (Pereira et al., 1978, Petryniak und Goldstein 1986). Die Größe der erkannten Glykoproteine liegt bei 80, 120 und 140 kD. Holthöfer et al. (1982) konnten eine Bindung des UEA 1 an vaskuläre Endothelzellen der Nabelschnurvene nachweisen und Hormia et al. (1983) erbrachten den Beweis für die Existenz des UEA 1 in HUVEC *in vitro*. Nelson et al. (1984) konnten feststellen, daß UEA 1 eine höhere Empfindlichkeit als Marker für Endothelzellen hat als vWF. Desweiteren erkennt UEA 1 das Antigen H in den Erythrozyten von Individuen mit der Blutgruppe 0 (Pereira et al., 1978).

Das Antithrombin III ist ein körpereigener Hemmstoff des Gerinnungssystems, der primär in der Leber gebildet wird. Er inhibiert Thrombin und hemmt die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Somit wirkt Antithrombin III an der Gerinnungskaskade mit. Chan und Chan (1979) konnten den Nachweis erbringen, daß auch Endothelzellen Antithrombin III synthetisieren und dadurch die Freisetzung von Fibronectin (Shearn et al., 1977) und Prostazyklin (Jaffe et al., 1974) stimulieren. Antithrombin III inhibiert die Serin-Protease, hat eine Molmasse von 64 kD und ist im Plasma vorhanden (Wu und Thiagarajan, 1996). Der verwendete Antikörper gegen Antithrombin III reagiert mit freiem Antithrombin III und Antithrombin-III-Protease Komplexen.

Proteine mit der Bezeichnung CD werden den humanen Leukozytenmarkern zugeordnet.

CD 31 ist ein membran Glykoprotein und erscheint in Endothelzellen mit einem molekularen Gewicht von 100 kD, in Thrombozyten von 130 kD. Es markiert auch Megakaryozyten und Plasmazellen und wurde von Parums et al. (1990) isoliert. Funktionell scheint es an der Bildung von Endothelzellkontakten und an Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten beteiligt zu sein.

Endoglin wird von vaskulären Endothelzellen der Arteriolen, Venolen und Kapillaren exprimiert (Letarte und Gougos, 1990). Es handelt sich hierbei um ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 95 kD (Gougos und Letarte, 1988), welches auch an Adhäsionsprozessen

beteiligt ist (Gougos et al., 1992). Endoglin wird als Bestandteil des TGF β (transforming growth factor β) Rezeptorsystems beschrieben und kann an die β 1 und β 3 Untereinheit binden. TGF β ist ein zirkulierendes Zytokin, das Proliferation, Differenzierung und Zelladhäsion reguliert. TGF β überträgt Signale durch Bindung an membrangebundene, spezifische Rezeptoren, wie z.B. Integrine (Cheifetz et al., 1992, Marazuela et al., 1995). Das Vorhandensein von Endoglin in den vaskulären Endothelzellen konnte von Letarte und Gougos (1988) nachgewiesen werden. Desweiteren konnte die Lokalisation des Endoglin-codierenden Gens auf dem Chromosom 9 des Menschen festgestellt werden. In der Literatur wird es auch synonym als CD 105 oder SN6H beschrieben. Ein weiteres Vorkommen dieses Markers wurde in unreifen Proerythroblasten, Synzytiotrophoblasten, aktivierten Makrophagen und stromalen Fibroblasten aus adultem und fetalem Leber- und Hautgewebe nachgewiesen (Letarte, 1995, Buhring, 1991, Lastres et al., 1992).

Bei unserer Studie konnten wir feststellen, daß ein Teil der Endothelmarker auch in den kultivierten RPE Zellen vorkommt. So banden die Antikörper gegen vWF und Antithrombin III an das RPE *in vitro*. Für die restlichen Antikörper konnte keine Bindung nachgewiesen werden, was auf einen nichtmesenchymalen bzw ektodermalen Ursprung dieser Zellen hinweist. Literaturrecherchen über den Nachweis von Endothelmarkern im RPE erwiesen sich als negativ und sind somit bisher noch nicht beschrieben worden. Bei unseren Untersuchungen an den Gewebeschnitten des Auges konnten wir keinen Anhalt für das Vorkommen der Endothelmarker vWF, UEA 1, AT III, CD31 und Endoglin finden. Dieses unterstützt die Vermutung, daß kultivierte RPE eine Trans- oder Dedifferenzierung aufgrund der veränderten Mikroumgebung durchlaufen. Allerdings kann auch die Anwendung eines polyklonalen Antikörper gegen vWF und AT III eine zu geringe Spezifität aufweisen, so daß ein positiver Nachweis in RPE Zellen gefunden wurde, der lediglich auf der Methodik beruht. Dieses muß in nachfolgenden Studien geklärt werden.

4.2.3 Intermediärfilamente

Das Zytoplasma von Vertebraten enthält drei Strukturklassen, die für die zellulären Bewegungsvorgänge und die Gestaltbildung der Zellen verantwortlich sind. Dazu zählen die Aktin-Mikrofilamente (5-6 nm), Mikrotubuli (20-26 nm) und die Intermediärfilamente (7-11 nm). Die Intermediärfilamente (IF) sind in vielen Fällen die entscheidenden Strukturkomponenten der Zellen und werden gewebe-spezifisch in fünf Klassen unterteilt (Lazarides, 1980). Desminfilamente verbinden benachbarte Z-Scheiben der Muskelzellen. Neurofilamente kommen in Axonen zentraler und peripherer Nervenzellen von Vertebraten vor. Das fibrilläre saure Gliaprotein (GFAP) bildet IF in den Gliazellen, von denen die Nervenzellen eingehüllt werden. Vimentin wird von Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimiert, z.B. von Fibroblasten, Adipozyten und Endothelzellen der Blutgefäße, kommt aber auch in bestimmten Epithelzellen vor. Die fünfte Gruppe der IF bilden die Zytokeratine. Man findet sie charakteristischerweise in Epithelzellen.

Mit ihren 30 verschiedenen Polypeptiden stellen die Zytokeratine die größte Untergruppe der IF dar. Rund 10 Zytokeratine kommen speziell in harten Geweben vor, wie Nägeln, Haar und tier-

ischer Wolle. Die restlichen 20 Zytokeratine werden normalerweise in Epithelgeweben gefunden, mit denen Körperhöhlen ausgekleidet sind. Diese Zytokeratine werden in Untereinheiten nach Säuren (Typ 1) und Basen (Typ 2) eingeteilt (Fuchs, 1988, Franke et al., 1981, Moll et al., 1982). Dabei besitzt jedes epitheliale Gewebe eine spezifische Verteilung von Keratinkomponenten und kann über seine spezifische Zytokeratinexpression identifiziert werden (Fuchs und Green, 1981).

Moll et al. (1982) erstellten einen Katalog der humanen Keratine, und bezeichneten sie numerisch von 1-19. Biochemisch ordneten sie die Keratinproteine nach ihrem Molekulargewicht (40-68 kD) und ihrem isoelektrischen Punkt (pH 5 bis 8) ein.

In dieser Studie wurde das Vorkommen von Zytokeratin 8, 18 und 19 sowie Zytokeratin Keratin-903TM (1, 5, 10, 14) untersucht. Das Zytokeratin 8 besitzt ein molekulares Gewicht von 52 kD, Zytokeratin 18 von 45 kD und Zytokeratin 19 von 40 kD. Moll et al. (1982) konnten ein Vorhandensein von Zytokeratin 8 und 18 in verschiedenen einfachen Epithelien, Tracheen, im transitorischen Epithel der Blase und in einigen komplexen Drüsen nachweisen.

Einfache Epithelien bilden normalerweise paarweise zwei bis vier Zytokeratine. Bei einfachen Epithelien ist die Kombination aus Zytokeratin 8 und 18 typisch. Zytokeratin 19 ist das kleinste humane Keratin und wurde in einfachen Epithelien gefunden. In einigen mehrschichtigen Epithelien, verschiedenen kultivierten Keratozyten (Fuchs und Green, 1981) und schuppigen Karzinomazellen konnte es ebenfalls nachgewiesen werden.

Die Zytokeratine 1,5,10 und 14 haben die folgenden korrespondierenden Molekulargewichte von 68 kD, 58 kD, 56,5 kD und 50 kD und werden charakteristischerweise in komplexen Epithelien gefunden. Der Antikörper reagiert dabei mit squamösen und duktalem Epithelien.

Vimentin ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 57 kD und wurde von Franke et al. (1978) als Intermediärfilament gefunden. Dieses Filament erscheint in verschiedenen mesenchymalen Zellen, wie Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen von Vertebraten (Franke et al., 1978, Schmid et al., 1979) und in einer Vielzahl von kultivierten Epithelzellen, ohne Rücksicht auf den Gewebeerstamm (Franke et al., 1978, Hynes und Destree, 1978) sowie in epithelialen Zelllinien (Osborn und Weber, 1983).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der bereits aufgeführten Zytokeratine und Vimentin in den RPE und den HUVEC untersucht. Dabei konnte der Nachweis der Zytokeratine 1, 5, 8, 10, 14, 18 und 19 in kultivierten RPE Zellen und für Zytokeratin 8 an den Gewebeschnitten des Auges erbracht werden. In den vaskulären Endothelzellen wurde kein Zytokeratin gefunden. Ein Nachweis von Vimentin konnte sowohl in der Zellkultur des RPE und HUVEC als auch an den Gewebeschnitten des Auges und der Nabelschnur erfolgen.

In der Literatur werden die Zytokeratine als epitheliale Marker für das RPE aufgeführt (Owaribe et al., 1988, Hunt und Davis, 1990). Bereits Hiscott postulierte im Jahre 1984, daß humane RPE Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Zytokeratin-haltige-Intermediärfilamente bilden. Das Auftreten der Zytokeratine wird in der Literatur als Argument für den ektodermalen Ursprung dieser Zellen benutzt. Ein Mangel an Zytokeratinen in der Zellkultur ist mit einem Verlust des epithelialen Phänotyps verbunden. Daher scheinen die Zytokeratine auch brauchbare Marker als Nachweis der Zelldifferenzierung des RPE *in vitro* zu sein. Schon Moll et al. (1982) konnten zeigen, daß die

Verteilung der Zytokeratinexpression in den RPE Zellen *in vitro* der anderer einfacher glandulärer Epithelien ähnlich ist, erkennbar an einer Übereinstimmung in den Zytokeratinen 7, 8, 18 und 19. In der Studie von McKechnie et al. (1991) konnte den Nachweis der Zytokeratine 5, 6, 7, 8, 14, 15, 16, 17, 18, 19 für RPE Zellen in Kultur erbracht werden. In einer anderen Arbeit von Miceli et al. (1996) wurde in kultivierten RPE Zellen die Zytokeratine 1, 5, 6, 7, 8, 10, 11 und 18 erkannt. Löffler und Lee (1986) konnten zeigen, daß die Zytokeratine 8 und 18 im RPE, Zytokeratin 19 eher in proliferierenden RPE Zellen exprimiert wurden. Dieses wurde in dieser Studie nicht beobachtet. Stattdessen wurde eine gleichmäßige Zunahme der Expression der drei Zytokeratine im Verlaufe der Passagen und mit Zunahme der Zellgröße nachgewiesen. Dieses konnte von Boulton und Marshall, (1985) für das Zytokeratin 18 ebenfalls beobachtet werden. Bei den verschiedenen Untersuchungen variierte die Intensität der Anfärbung bezüglich der Zytokeratine. Eine Anfärbung war jedoch in jedem Fall lichtmikroskopisch zu erkennen. Dies läßt darauf schließen, daß die RPE Zellen trotz eines morphologischen Shifts ihre epithelialen Eigenschaften *in vitro* nicht verloren haben. Im Gegensatz dazu stellten Grisanti und Guidry (1995) einen Verlust von Zytokeratinen in der Zellkultur von Schweine RPE fest und beschrieben ihn als Transdifferenzierung. Beim Nachweis des gemeinsamen Epitops der Zytokeratine 1, 5, 10 und 14 fiel auf, daß hauptsächlich große, polygonale, in Teilung begriffene RPE Zellen *in vitro* intensiv angefärbt wurden. Es scheint, daß die Expression vom Wachstumsstadium abhängig ist. Davis et al. (1995) stellten bei ihren Untersuchungen an RPE Zellen der Ratte fest, daß ein größeres Spektrum an Zytokeratinen bei kultivierten Zellen gefunden wurde. RPE Zellen besitzen *in vivo* charakteristische Keratine einfacher Epithelien, wie Zytokeratin 8 und 18 (Hunt und Davis, 1990, Fuchs et al., 1991). Dieses konnte in dieser Arbeit nur für Zytokeratin 8 bestätigt werden.

Der Nachweis weiterer spezieller Zytokeratine an Gewebeschnitten des menschlichen Auges erfordert weitere Untersuchungen.

In unserer Studie wurde neben dem Nachweis der Zytokeratine auch Vimentin *in vivo* und *in vitro* bei den humanen RPE nachgewiesen. Der Frage, warum ein mesenchymaler Marker von epithelialen Zellen exprimiert wird, wurde in der Literatur mehrfach nachgegangen. Bei den humanen RPE Zellen wurde bereits der Nachweis der Koexpression für die Zytokeratine und Vimentin *in vivo* und *in vitro* erbracht (McKechnie et al., 1991). Lane et al. (1983) und La Rocca und Rheinwald (1984) zeigten auch für andere epitheliale Zelltypen die Existenz einer solchen Koexpression.

RPE Zellen nicht aller Tierarten exprimieren Vimentin (Owaribe et al., 1988). So konnte in den RPE Zellen von Affen, Fröschen, Mäusen und Ratten (Owaribe et al., 1988, Guerin et al., 1990) kein Vimentin gefunden werden, im Gegensatz zu bovinen, porcinen und humanen RPE Zellen. Unterschiedliche Interpretationen über Funktion und Existenz dieses Intermediärfilaments in RPE Zellen sind in der Literatur angegeben. So gingen Docherty et al. (1984) davon aus, daß Vimentin dem Zytokeratin in der Funktion gleicht, indem es die Adhäsion zu den angrenzenden Zellen bewirken soll. Diese Hypothese wurde bisher nicht bestätigt. Hunt und Davis (1990) und Matsumoto et al. (1990) konnten Vimentin nur in kultivierten RPE Zellen nachweisen. Zusammen mit Virtanen et al. (1981) teilten sie die Auffassung, daß sich unter Kulturbedingungen eine Veränderung des Phänotyps der Epithelzellen ergibt.

Bei den Untersuchungen an Gewebeschnitten des Auges konnte Zhao et al. (1997) unter physiologischen Bedingungen keine Vimentinexpression in RPE Zellen *in vivo* nachweisen jedoch bei pathologischen Veränderungen, wie einer Ablatio retinae wurde Vimentin gefunden (Zhao et al., 1997). In den Studien von Fuchs et al. (1991) wird auf eine Expression von Vimentin im RPE *in vivo* hingewiesen. Somit scheinen die RPE Zellen Vimentin *in vivo* auch unter normalen Bedingungen zu synthetisieren.

Zusammenfassend unterscheiden sich RPE und HUVEC voneinander durch Expression von Zytokeratinen im RPE. Dieses unterstützt die These eines ektodermalen Ursprungs der RPE Zellen. Die vaskulären Endothelzellen exprimieren aufgrund ihres mesenchymalen Ursprungs keine Zytokeratine, sondern Vimentin *in vivo* und *in vitro*. Bei der Untersuchung des Intermediärfilamentes Vimentin konnte eine gemeinsame Expression in beiden Zelltypen festgestellt werden. Dieses könnte ein Indiz für eine Sonderstellung der RPE Zellen oder eine Transdifferenzierung darstellen.

4.2.4 Neuronen-spezifische Enolase (NSE)

Die Enolase ist ein aus drei Untereinheiten (alpha, alpha, alpha) bestehendes Enzym. Im Zellstoffwechsel ist es mit seinen verschiedenen Isoformen (alpha-alpha, alpha-alpha, alpha-alpha, alpha-alpha und alpha-alpha) an der anaeroben Glykolyse beteiligt. Shimuzi et al. (1983) konnten nachweisen, daß es sich dabei eindeutig um ein Protein handelt. Die auch als alpha-Enolase bezeichnete NSE wurde 1968 von Moore und Perez isoliert und von Marangos et al. (1976) benannt. Ihr Molekulargewicht beträgt 46 kD.

Sie befindet sich hauptsächlich in Neuronen, Axonen und Zellen des neuroendokrinen Systems (Marangos et al., 1978, Schmechel et al. 1978, Tapia et al. 1981).

NSE fungiert als Marker für neuronale Zellen, indem es den neuroektodermalen Ursprung der Zellen während ihrer Entwicklung beweist. Desweiteren dient sie dem Studium der Zelldifferenzierung *in vivo* und *in vitro*.

Bei unseren Untersuchungen konnten wir feststellen, daß das retinale Pigmentepithel den polyklonalen, nicht aber den monoklonalen Antikörper gegen NSE *in vivo* und *in vitro* exprimiert. Der Nachweis des polyklonalen Antikörpers gegen NSE in den RPE Zellen *in vivo* und *in vitro* spricht für neuronale Eigenschaften dieser Zelle. Er erklärt aber nicht das Vorhandensein dieses Markers auch in HUVEC Zellen, die mesodermalen Ursprungs sind und sich nicht aus dem Neuroektoderm entwickelten. Daher ist der eingesetzte Antikörper gegen NSE möglicherweise als polyklonaler Marker zu unspezifisch. Im Gegensatz zu dem hier getesteten monoklonalen Antikörper zeigten die RPE Zellen keine Markierung im Vergleich zu früheren Untersuchungen (Böhnke, Vogelberg und Engelmann, 1998).

Beim Studium der Literatur über diesen Zellmarker konnte der Antikörper gegen NSE in Zellkulturen des RPE von Viores et al. (1993) nachgewiesen werden. Viores (1995) stellte fest, daß das RPE relativ labil gegenüber der Umgebung ist. Es besitzt ein Potential, sich entsprechend der äußeren Einflüsse zu transdifferenzieren. So können kultivierte RPE in Neurone umgewandelt werden (Okada,

1983) oder in Linsen bzw- retinale Zellen transdifferenzieren (Stroeva und Mitashov, 1983, Itoh und Eguchi, 1986, Park und Hollenberg 1989). Auch externe Stimuli, wie bFGF können RPE Zellen zu retinalen Vorläuferzellen transdifferenzieren lassen, die dann NSE exprimieren. Pittack et al. (1991) konnte das an RPE Zellen von Küken *in vitro* nachweisen.

Von Bedeutung ist, daß weder der Phänotyp des gereiften RPE, noch der von retinalen Zellen fixiert ist, sondern einer in den anderen übergehen kann durch eine Veränderung des internen Zellzustandes. Es scheint, als wenn der Antikörper gegen NSE neuron-assoziert und nicht wie normalerweise neuron-spezifisch an die RPE Zellen bindet, da neuron-ähnliche Zellen entstehen (Vinores, 1995).

Bei der Subkultivierung der RPE Zellen trat mit Zunahme der Passage eine Abnahme der NSE Expression auf. Dieses wurde rein qualitativ nachgewiesen und ist ein Indiz dafür, daß Erscheinungen der Seneszenz einhergehen mit der Abnahme der neuronalen Eigenschaften der RPE Zelle. Die Analyse weiterer neuronaler Marker, wie z.B. N-CAM (neural cell adhesion molecule, (Zhao et al., 1997, Zhou und Opas, 1994) und Tubulin Isotyp III (Zhao et al. 1997) und die Verwendung anderer Antikörper gegen NSE könnte weitere Hinweise auf einen neuronalen Ursprung dieser Zellen geben.

4.2.5 Antikörper 9.3.E

Mit dem Ziel, einen monoklonalen Antikörper gegen die humanen kornealen Endothelzellen (HCEC) *in vitro* zu finden, wurden von Engelmann (1995) Balb-c Mäuse mit humanen kornealen Endothelzellen immunisiert. Anschließend wurden die Milzzellen der Tiere isoliert und mit Myelomazellen fusioniert. Die dabei erhaltenen Hybridomazelllinien wurden selektiv angezüchtet, deren Antikörperproduktion (IgG) in einem ELISA-Test überprüft und positive Zellklone isoliert. Im Vergleich zu sieben anderen endothelialen und fibroblastischen Zelltypen wurde die Spezifität des Antikörpers auf HCEC untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, das der Klon 9.3.E ein Antigen erkennt, welches nicht Kornea- aber humanspezifisch ist und auch in HUVEC nachweisbar ist, nicht jedoch in Fibroblasten.

Auch Foets et al. (1992) arbeitete mit diesem Antikörper und wies ebenfalls eine spezifische Bindung des Antikörpers an HCEC und HUVEC nach.

Das Ergebnis dieser Untersuchung war eine positive Reaktion sowohl bei den RPE Zellen als auch bei HUVEC. Es scheint, daß der Antikörper 9.3.E an eine Substanz bindet, die sich in der Basalmembran befindet (Engelmann, 1995). RPE und HUVEC Zellen besitzen eine Basalmembran. Während bei den HUVEC eine gleichmäßige Anfärbung *in vitro* auftrat, änderte sich die Anfärbbarkeit beim RPE in Kultur in Abhängigkeit vom Konfluenzstadium. Bei Subkonfluenz trat eine Färbung innerhalb der Zelle, insbesondere des Zellkernes, auf. Bei konfluenten Kulturen wurden nur noch die Zellränder angefärbt. Die Bindung des Antikörpers 9.3.E scheint eine Wanderung von einem Zytoplasma-assozierten zu einem Membran-assozierten Antigen darzustellen. Im Western Blot erkannte der Antikörper 9.3.E ein 130 kD Protein in den Zellextrakten der vaskulären

Endothelzellen und retinalen Pigmentepithelzellen. Das Erkennen eines Proteins mit einem MG von 130 kD bei HUVEC und HCEC wurde bereits von Engelmann (1995) und Foets et al. (1992) beschrieben.

Obwohl diese drei Zellarten unterschiedlich lokalisiert und verschiedenen Ursprungs sind besitzen sie ein gemeinsames, vom Antikörper 9.3.E erkanntes Protein. Struktur und Funktion dieses Proteins sind bisher ungeklärt.

4.2.6 *In vivo- in vitro* Vergleich

Ziel des Vergleiches war die Charakterisierung der RPE Zellen hinsichtlich der Expression typischer Markerproteine im Unterschied von natürlicher Umgebung zur Zellkultur, wo die Zellen ihrem Gewebeverband entzogen wurden. Diese Untersuchungen wurden parallel bei den HUVEC durchgeführt, einem gut charakterisierten Zelltyp.

Der Vergleich der immunologischen Eigenschaften in den RPE und HUVEC konnte nur in begrenztem Maße durchgeführt werden, da nicht alle in der Zellkultur angewandten Antikörper zur Untersuchung an Gewebeschnitten eingesetzt wurden, bzw. dabei keine Reaktion zeigten.

Desweiteren kann der Einsatz von jeweils nur einer Gewebeprobe (ein Auge und eine Nabelschnur) zur Paraffinschnittherstellung das Vorkommen eines Markerproteins nicht sicher beweisen.

Intermediäre Filamente

In unserer Studie wurden die Zytokeratine 8 und 18 sowie Vimentin an den Gewebeschnitten des Auges und der Nabelschnur untersucht. Bei den Gewebeschnitten des Auges war im Bereich des RPE ein Binden der Antikörper gegen Zytokeratin 8 und Vimentin zu erkennen. Diese Ergebnisse sind mit denen in der Zellkultur dieser Zellen identisch und können als Erhalt ihrer biochemischen Eigenschaften *in vitro* gedeutet werden. Das Fehlen der Zytokeratin 18 Expression muß weiter untersucht werden.

In den Gewebeschnitten der Nabelschnur wurde im Bereich der HUVEC nachgewiesen, daß der Antikörper gegen Vimentin, nicht jedoch gegen die Zytokeratine 8 und 18 band. Der fehlende Nachweis der Zytokeratine in den HUVEC beweist ihre nichtepitheliale Herkunft.

Zellassozierte Proteine (Endothelzellmarker)

Als Nachweis für die Endothelzellen wurden spezifische Zellmarker, wie vWF und Endoglin, eingesetzt. In den Paraffinschnitten der Nabelschnurvene konnte die Expression beider Marker an HUVEC gezeigt werden, was mit der Expression dieser Marker von HUVEC *in vitro* übereinstimmte.

Die Endothelmarker vWF und Endoglin konnten am Gewebeschnitt des Auges nicht im RPE nachgewiesen werden. Im Bezug auf das Endoglin konnte auch in kultivierten RPE keine Expression bestätigt werden, während vWF in kultivierten RPE Zellen nachgewiesen wurde. Dieses läßt auf eine Veränderung der RPE Zelle unter Kulturbedingungen schließen, oder spricht für eine unспеzi-

fische Bindung des polyklonalen Antikörpers in Kultur. Das Fehlen von vWF in den RPE *in vivo* unterstützt die These, daß sich die Zellen nicht aus dem Mesenchym entwickeln.

Neuroendokriner/neuroektodermaler Marker (NSE)

Der Nachweis des polyklonalen Antikörpers gegen NSE in den Gewebeschnitten des Auges und der Nabelschnur sowie in Kultur weist auf neuronale Eigenschaften der RPE Zellen hin, begründet aber nicht das Vorhandensein in den HUVEC, einem Zelltyp, der sich aus dem Mesoderm entwickelte. NSE, als polyklonaler Marker, ist möglicherweise zu unspezifisch und bedarf weiterer Untersuchungen.

Matrixkomponenten

Der Nachweis der Matrixkomponenten Fibronectin, Laminin und Kollagen IV konnte weder in den Gewebeschnitten des Auges, noch der Nabelschnur erbracht werden und muß weiter untersucht werden. Eine Expression dieser Komponenten wurde in den Zellkulturen von den RPE und HUVEC gefunden

4.3 Ausblick

Die immunhistochemische Charakterisierung des humanen retinalen Pigmentepithels dient der Identifizierung der *in vitro* etablierten Zelle. Sie überprüft biochemische Eigenschaften der RPE Zellen *in vivo* und *in vitro* und untersucht deren Abhängigkeit von morphologischen Veränderungen in der Zellkultur. Die verwendeten Zellkulturen zeigen eine gute Antigenexpression, sind folglich in einem guten Vitalitäts- und Funktionszustand *in vitro*.

Die in unserer Arbeit verwendeten kultivierten RPE scheinen daher für weitere Untersuchungen von Funktionsstörungen im RPE sowie für eine mögliche Transplantation geeignet.

In der vorliegenden Arbeit wurden kultivierte humane, retinale Pigmentepithelzellen hinsichtlich spezifischer Zellmarker immunhistochemisch charakterisiert. Dabei sollte der ontogenetische Ursprung des RPE untersucht werden, ob das RPE ein reines Epithel oder auch Eigenschaften mit mesenchymalen Zellen teilt. Als Vergleichszellen dienten vaskuläre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene.

Aufgrund von morphologischen Veränderungen in der Zellkultur sollte das Vorkommen spezifischer Markerproteine in den kultivierten RPE untersucht werden.

Die RPE Zellen und die HUVEC wurden immunhistochemisch auf Matrixkomponenten, Endothelzellmarker, bestimmte Intermediärfilamente, neuroektodermale Marker und auf die Reaktion mit dem Antikörper 9.3.E untersucht. Beide Zellarten bildeten übereinstimmend die drei untersuchten Matrixkomponenten, Laminin, Fibronektin und Kollagen IV. Für Fibronektin konnte eine Korrelation zwischen der Zelldichte in der Kultur und der Passage und der Bildung dieser Matrixkomponenten dargestellt werden. Es zeigte sich, daß sich HUVEC durch das Vorhandensein von Endothelmarkern, wie Ulex europaeus Lektin 1, Endoglin und CD 31 vom RPE unterscheidet. Dieses ist ein Indiz für den mesenchymalen Ursprung der HUVEC und die ektodermale Herkunft der RPE. Von beiden Zellarten in Kultur wurden die Endothelmarker vWF und Antithrombin III gebildet. Dieser Nachweis ließ sich aber nicht an den Gewebeschnitten des Auges bestätigen und läßt eine Trans-oder Dedifferenzierung der RPE *in vitro* vermuten. Zellmarker, die nur vom RPE exprimiert wurden, waren die Zytokeratine 1, 5, 8, 10, 14, 18 und 19. Deren Nachweis kann als spezifisches Charakteristikum epithelialer Zellen gewertet werden. Weitere Gemeinsamkeit beider Zellarten war der Nachweis von NSE, Vimentin und 9.3.E. in RPE und HUVEC. Dabei weist das Vorkommen von NSE auf neuronale Eigenschaften, Vimentin auf eine Transdifferenzierung und 9.3.E auf das Vorhandensein einer Basallamina in den RPE *in vitro* hin.

Zusammenfassend kann herausgearbeitet werden, daß das RPE hinsichtlich seines neuroektodermalen Ursprungs über mehrere Passagen, auch unabhängig vom Differenzierungsgrad, charakterisierbar ist. Ebenfalls zeigt sich eine typische Ausbildung von Matrixkomponenten, die darauf hinweisen, daß das RPE seinen adhäsiven Charakter bei der Kultivierung behält. Das Vorhandensein der Zytokeratine deutet auf die Beibehaltung ihres epithelialen Charakters hin.

6. Literaturverzeichnis

Adamis AP, Shima DT, Yeo KT, Yeo TK, Brown LF, Berse BD, Amore PA, Folkman J; Synthesis and secretion of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells, 1993, *Biochem Biophys Res Commun* 193:631-638

Albelda SM, Buck CA, Integrins and other cell adhesion molecules, 1990, *FASEB J* 4:2868-2880

Bairati A, and Orzalesi N, The ultrastructure of the pigment epithelium and of the photoreceptor pigment epithelium junction in the human retina, 1963, *J. Ultrastruct. Res* 9:484-496

Baumgartner I, Asenbauer TT, Kaminski SL, Grabner G, Mayr WR; Retinal pigment epithelial cells in post mortem HLA typing of corneal donors, 1992, *Inves Ophthalmol Vis Sci* 33:1940-1945

Bennett GS, Fellini SA, Croop JM, Otto JJ, Bryan J and Holtzer H; Differences among the 100A filament subunits from different cell types, 1978, *Proc Nat Acad Sci USA* 75, 4364-4368

Birdwell CR, Gospodarowicz D, Nicholson GL; Identification, localization and role of fibronectin in cultured bovine endothel cells, 1978, *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 3273-3277

Blum, H; Beier, H; Gross, HJ; Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels, 1987, *Elektrophoresis* 8: 93-99

Böhnke M; Spendergewebe für die Keratoplastik- Erfahrungsbericht aus der Hamburger Hornhautbank, 1991, *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* 198:562-571

Böhnke M, Vogelberg K, Engelmann K; Detection of neurone-specific enolase in long-term cultures of human corneal endothelium,, 1998, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol.* 236:522-526

Boulton M, Marshall J; Repigmentation of human retinal pigment epithelial cells in vitro, 1985, *Exp Eye Res* 41:209-218

Bradford, MM; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding, 1976, *Analyt. Biochem.* 72:248-254

Buhring H; Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow, 1991, *Leukemia* 5:841-847

Burke JM, Skumatz CMB, Irving PE, McKay BS; Phenotypic Heterogeneity of retinal pigment epithel cells in vitro and in situ, 1996, *Acad Press Limited*, 63-73

Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM; Serum contains chemoattractants for human retinal pigment epithelial cells, 1984, Arch Ophthalmol 102:1830-1833

Campochiaro PA, Jerdan JA, Glaser BM; The extracellular matrix of human retinal pigment epithelial cells in vivo and its synthesis in vitro, 1986, Invest. Ophthalmol Vis. Sci 24:1615-1621

Campochiaro PA, Sugg R, Grotendost G, Hjelmeland LM; Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media, 1989, Exp Eye Res 49:217-227

Campochiaro, PA, Hackett, SF, Conway BP; Retinoic acid promotes density-dependent growth arrest in human retinal pigment epithelial cells, 1991 Invest. Ophthalmol. Vis Sci 32:65-72

Campochiaro PA, Hackett SF; Corneal endothel cell matrix promotes expression of differentiated features of retinal pigmented epithelial cells: Implication of laminin and basic fibroblast growth factor as active components, 1993, Exp. Eye Res. 57:271-280

Chan V, Chan TK; Antithrombin III in fresh and cultured human endothelial cells: a natural anticoagulant from the vascular endothelium, 1979, Thromb Res 15:209-213

Cheifetz S, Bellon T, Cales C; Endoglin is a component of the transforming growth factor- β system in human endothelial cells, 1992, J Biol Chem 267:19027-19030

Chung AE, Jaffe R, Freeman IL, Vergnes JP, Braginski JE Charlin B; Properties of a basement membrane-related glycoprotein synthesized in culture by a mouse embryonal carcinoma-derived cell line, 1979, Cell 16:277-287

Coulombre, AJ; Roles of the retinal pigment epithelium in the development of ocular tissue. In Zinn KM, Marmor MF, editors. The retinal pigment epithelium. Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1979

Davis A, Bernstein P, Bok D, Turner J, Nachtgal M, Hunt R; A human retinal pigment epithelial cell line that retains epithelial characteristics after prolonged culture, 1995, Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 955-964

Docherty RJ, Edwards JG, Garrod DR, Mattel DL; Chick embryonic pigmented retina is one of the group of epitheloid tissue that lack cytokeratins and desmosomes and have intermediate filaments composed of vimentin, 1984, J Cell Sci 71:61-74

Docherty RJ, Forrester JV, Lackie JM; Type I collagen permits invasive behaviour by retinal pigment epithelial cells in vitro, 1987, J. Cell Sci. 87, 399-409

Dunn DC, Aotaki-Keen AE, Puutkeyy FR, Hjelmeland LM; ARPE-19 A Human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties, 1996, *Exp Eye Res* 62: 155-169

Dutt K, Scott MM, DelMonte M, Brennam M, Harris-Hooker S, Kaplan HJ, Verly G; Extracellular matrix mediated growth and differentiation in human pigment epithelial cell, 1991, *Curr. Eye Res.* 10: 1089-1100

End P, Engel J; in *Receptors for Extracellular Matrix Proteins*, 1991, (Mecham, RP & McDonald, J Eds) pp 79-129, Academic Press, New York

Engelmann K, *Humanes adultes korneales Endothel in der Zellkultur: Methoden zur Isolierung, Charakterisierung und Züchtung der Zellen von Spenderhornhäuten Erwachsener und anschließender Erprobung der Endothelzelltransplantation in einem in vitro-Modell*, 1995, Habilitationsschrift, Fachbereich Medizin, Universität Hamburg

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor, 1990, *Nature* 347: 83-86

Federspiel BSS, Cras P, Gheuens J, Andries D, Lowenthal A; Human alphaalpha-enolase: two-site immunoradiometric assay with a single monoclonal antibody, 1987, *J Neurochem* 48:22-28

Feeney L, The phagosomal system of the pigment epithelium: a key to retinal disease, 1973, *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 12:635-638

Ferris FL III, Fine SL Hyams L; Age-related macular degeneration and blindness due to neovascularisation maculopathy, 1984, *Arch Ophthalmol* 102:1640-1642

Flannery JG, O'Day W, Pfeffer BA, Horwitz J, Bok D; Uptake, processing and release of retinoids by cultured human retinal pigment epithelium, 1990, *Exp Eye Res* 51:717-728

Flood MT, Bridges CD, Alvarez RA, Blaner WS, Gouras P; Vitamin A utilization in human retinal pigment epithelial cells in vitro, 1983, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:1227-1235

Foets B, Oord JJ van den, Engelmann K, Missotten L; A comparative immunohistochemical study of human corneotrabeular tissue, 1992, *Graefe's Arch Ophthalmol* 230: 269-274

Franke WW, Schmid E, Osborn M, Weber K; Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy, 1978, *Proc Nat Acad Sci USA* 75:5034-5038

Franke WW, Schiller DL, Moll R; Diversity of cytokeratins: differentiation specific expression of cytokeratinpolypeptides in epithelial cells and tissue, 1981, J Mol Biol 153:933-959

Friedl, P; Tatje, D; Czapl, R; An optimized culture medium for human vascular endothelial cells from umbilical cord veins; 1989, Cytotechnology 2:171-172

Fryer DG, Birnbaum G, Luttrell CN; Human endothelium in cell culture, 1966, J Atheroscler Res 6:151-153

Fuchs E, Green H; Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A, 1981, Cell 25: 617-625

Fuchs E; Keratins as biochemical marker of epithelial differentiation, 1988, Trends Genet 4: 277-281

Fuchs U, Kivelä T, Tarkanen A; Cytoskeleton in normal and reactive human retinal pigment epithelial cells, 1991, Invest Ophthalmol Vis Sci 132:3178-3186

Gauss-Mueller V, Kleinman HK, Martin GR, and Schiffmann E; Role of attachment and attractants in fibroblasts chemotaxis, 1980, J Lab Clin Med 96:1071

Gimbrone JR, Ramzi S, Cotran RS, Folkman J; Human vascular endothelial cells in culture: growth and DNA synthesis, 1974, J Cell Biol. 60: 673-684

Gimbrone JR, Shefton EJ, Cruise SA; Isolation and primary culture of endothelial cells from human umbilical vessel, 1978, TCA Manual 4:813-818

Gorfien S, Spector A, DeLuca L, Weiss S,; Growth and physiological functions of vascular endothelial cells in a new serumfree medium (SFM), 1993, Exp Cell Res 206:291-301

Gospodarowicz D, Delgado D, Vlodavsky I; Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation in vitro, 1980, Proc Natl Acad Sci USA 77:4094-

Gougos A, Letarte M; Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line, 1988, J Immunol 141: 1925-1940

Gougos A, Jacques St, Greaves A, O'Connell PJ, d'Apice AJF, Bühring HJ, Bernabeu C, van Mourik JA, Letarte M; Identification of distinct epitopes of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of endothelial cells, leukemic cells, and syncytiotrophoblasts, 1992, Int Immunol 4:83-92

- Gouras P, Lopez R; Transplantation of retinal cells, 1990, *Neuro-Ophthalmol.* 10:165
- Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH; Pathologic features of senile macular degeneration, 1985, *Ophthalmol* 92:615-627
- Greenwood J, Pryce G, Devine L, Male DK, Dos Santos WLC, Calder VL, Adamson P; SV 40 large T immortalised cell lines of rat blood-brain and blood-retinal barriers retain their phenotypic and immunological characteristics, 1996, *J Neuroimmun* 71:51-63
- Grierson I, Hiscott P, Hogg P, Robeyyy H, Mazure A, Larkin G, Development, repair and regeneration of the retinal pigment epithelium, 1994, *Eye*, 8:255-62
- Grisanti S, Guidry C; Transdifferentiation of retinal pigment epithelial cells from epithelial to mesenchymal phenotype, 1995, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 391-405
- Guerin CJ, Anderson DH, Fisher SK; Changes in intermediate filament immunolabeling occur in response to retinal detachment and reattachment in primates, 1990, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:1474
- Hamel C, Tsilou E, Pfeffer B, Hooks J, Detrick B, Redmond TM; Molecular cloning and expression of RPE 65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro *J Biol Chem* 268:15751-15757
- Heukeshoven, J; Dernick, R; Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining, 1985, *Electrophoresis* 6:103-112
- Heukeshoven, J; Dernick, R; Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem development unit I. staining of sodium dodecyl sulfate gels, 1988, *Electrophoresis* 9:28-32
- Hiscott PS, Grierson I, McLeod D; Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study, 1984, *Br J Ophthalmol* 68:708-715
- Hiscott P, Morino I, Alexander R, Grierson I, Gregor Z, Cellular components of subretinal membranes in proliferative vitreoretinopathy, 1989, *Eye* 3:606
- Hogan MJ; Bruch's membrane and disease of the macula: Role of elastic tissue and collagen, 1967, *Trans Ophthalmol Soc UK* 87:113
- Hogan MJ, Alvarado JA, Weddell JE; *Histology of the Human Eye*, 1971, Philadelphia: W.B. Saunders, Chap. 9, 393-522

Hogan MJ; Role of the retinal pigment epithelium in macular disease., 1972, Trans. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol. 76: 64-80

Holthöfer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A; Ulex europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues, 1982, Laboratory Invest 47: 60-66

Hormia M, Lehto VP, Virtanen I, Identification of UEA I-binding surface glycoproteins of cultured human endothelial cells, 1983, Cell Biol Intern Rep 7, 6:467-475

Hsu SM, Raine L, Fanger H; et al.; Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, 1981, J Histochem Cytochem 1981;29:577-580

Hunt RC, Davis AA; Altered expression of keratin and vimentin in human retinal pigment epithelial cells in vivo an in vitro, 1990, J Cell Physiol 145: 187-199

Hynes RO, Destree AT, 10 nm filaments in normal and transformed cells, 1978, Cell 13 151-163

Hynes RO; Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information, 1992, Cell 69, 11-25

Itoh K, Eguchi G, In vitro analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: A unique model system for studying cellular and molecular mechanism of transdifferentiation, 1986, Dev Biol 115: 353-362

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR,; Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, 1973b, J Clin Invest 53: 2745-2756

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL; Synthesis of antihemophilic factor by cultured human endothelial cells, 1973a, J Clin Invest 52:2757-2764

Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL; Synthesis of von Willebrand factor by cultured human endothelial cells, 1974, Proc Soc Nat Acad Sci 71:1906-1909

Jaffe MD; Endothelial cells and the biology of factor VIII, 1977, New Eng J of Med 296:377-383

Jarmolych J, Daoud AS, Landau J, Fritz KE, McElvene E; Aortic media explants. Cell proliferation and production of mucopolysaccharides, collagen, and elastic tissue, 1968, Exp Mol Pathol 9:171-73

- Jones W; Notice relative to the pigmentum nigrum of the eye, 1833, *Edin. Med Surg. J.* 40: 77-83
- Kliffen M, Mooy MM, Luider TM, de Jong; Analysis of carbohydrate structures in basal laminar deposit in aging human maculae, 1994, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2901-2905
- Knedler A, Ham RG; Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum, 1987, *In Vitro* 23:481-491
- Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA; Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction, 1995, *Proc of the Nat Acad of Sci of the United States of Amerika*, 92:1307-11
- Krott R, Heimann K; Altersabhängige Makuladegeneration, 1996, *Deutsches Ärzteblatt* 93:823-826
- Laemmli, UK; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, *Nature* 227:680-685
- Lane EB, Hogan BLM, Kurkinen M, Garrels JI; Coexpression of vimentin and cytokeratins in parietal endoderm cells of early mouse embryo, 1983, *Nature* 303:701-704
- LaRocca PJ, Rheinwald JG; Coexpression of simple epithelial keratins and vimentin by human mesothelium and mesothelioma in vivo and in culture, 1984, *Cancer Res.* 44:2991-2999
- Lastres P; Regulated expression on human endothelial macrophages, an Arg-Gly₂Asp-containing surface antigen, 1992, *Eur J Immunol* 22:393-397
- Lazarides E; Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, 1980, *Nature* 283, 249-256
- Lemeunier A, Burri PH, Weibel E; Absence of acid phosphatase activity in specific endothelial organelles, 1969, *Histochemie* 20:143
- Letarte M, Gougos A; Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells, 1990, *J of Biol Chem* 265, No 15:8361-8364
- Letarte M, CD 105 (endoglin) cluster report, 1995, In Schlossman SF et al. (eds) *Leucocyte Typing V White Cell Differentiation Antigens.* Oxford University Press (Oxford)1756
- Lerche W; Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Differenzierung des Pigmentepithels und der äußeren Körnerzellen im menschlichen Auge, 1963a, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 58:953-970

Lerche W; Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Bruch'schen Membran des Menschen, 1963b, Ber. Dtsch. Ophthalmol. Gesch. 65:384-393

Li L, Turner J; Long term rescue of photoreceptor cells in retinas of RCS rats by RPE transplants, 1990, Prog Brain Res 22:179-

Li W, Stramm LE, Aguirre GD, Rockey JH; Extracellular matrix production by cat retinal pigment epithelium in vitro: characterization of type IV collagen synthesis, 1984, Exp Eye Res 38: 291

Liotta LA, Vembu D, Kleinman HK, Martin GR, Boone C; Collagen required for proliferation of cultured connective tissue cells but not their transformed counterparts, 1978, Nature 272:622

Little D, Said JW, Siegel RL, Faely M, Fishbein MC; Endothel cell markers in vascular neoplasms: An immunohistochemical study comparing factor VIII-related antigen, blood group specific antigens, 6-kerato-PGF-1 alpha and ulex europaeus I lectin, 1986, J Pathol 149:89-95

Löffler KU, Lee WR; Basal linear deposit in the human macula, 1986, Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224:493-501

Loring J, Glimelius B, Weston JA, Extracellular matrix materials influence quail neural crest cell differentiation in vitro, 1982, Dev Biol 90:165-

Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr, AL, Randall, RJ; Protein measurment with the folin phenol reagent, 1951, J. Biol. Chem. 193, 265-275

Machemer R, Laqua H; Pigment epithelial proliferation in retinal detachment, 1975, Am J Ophthalmol 80:1-23

Marangos PJ, Zomzely-Neurath C, York C; Determination and characterizat on of neuron specific protein (NSP) associated enolase activity, 1976, Biochem Biophys Res Commun 68:1309-1316

Marangos PJ, Zis AP, Clark RL, Goodwin FK; Neuronal, non-neuronal and hybrid forms of enolase in brain: structural, immunological and functional comparisons, 1978, Brain Res 150: 117-133

Marazuela M, Sanchez-Madrid F, Acevedo A, Larranaga E, De Lndazuri MO; Expression of vascular adhesion molecules in autoimmune thyroid disorders, 1995, Biochem Biophys Res Immunol 102:328-334

Marshall GE, Konstas AGP, Reid GG, Edwards JG Lee WR; Type IV collagen and laminin in Bruch's membrane and basal linear deposit in the human macula, 1992, Brit J of Ophthalmol 76:607-614

Martini B, Pandey R, Ogden TE, Ryan SJ; Cultures of human retinal pigment epithelium. Modulation of extracellular matrix, 1992, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:516-521

Maruyama Y; The human endothelial cell in tissue culture, 1963, *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 60:69-77

Matsumoto B, Guerin CJ, Anderson DH; Cytoskeletal redifferentiation of feline, monkey, and human RPE cells in culture, 1990, *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 31:879-889

McKechnie NM, Boulton M, Robey HL, Savage FJ, Grierson I; The cytoskeletal elements of human retinal pigment epithelium, 1991, *J Cell Sci* 91: 303-312

McLaren MJ, Sasabe S, Li CY, Brown ME, Inana G; Spontaneously arising immortal cell line of rat retinal pigmented epithel cells, 1993, *Exp Cell Res* 204:311-320

Mecham RP; 1991, *FASEB J* 5, 2538-2546

Miceli MV, Newsome DA; Effects of extracellular matrix and Bruch's membrane on retinal outer segment phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium, 1996, *Curr. Eye Res.* 15:17-26

Millard PR, Chaplin AJ, Heryet AR, McDougall AC; Factor VIII related antigen positive macrophages and acquired immunodeficiency syndrome (aids): a problem of antibody specificity, 1987, *J Clin Pathol* 40:262-266

Mircheff AK, Miller SS, Farber DB, Bradley ME, O'Day WT, Bok D, Isolation and provisional identification of plasma membrane populations from cultured human retinal pigment epithelium, 1990, *Invest. Ophthalmol. Vis Sci* 31:863-878

Moll R, Franke WW, Schiller DL; The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells, 1982, *Cell* 31:11-24

Moore BW, Perez VJ; Specific acidic proteins of the nervous system, 1968, In: *Physiological and biochemical aspects of nervous integration*, Carlson FD (ed), Englewood Cliffs NJ: Prentice-Hall, pp 343-360

Mukai K, Rosai J, Burgdorf W; Localization of factor VIII-related antigen in vascular endothelial cells using an immunoperoxidase method, 1980, *Am J Surg Pathol* 4: 273-276

Nelson G, Ordonez MD, John G, Batsakis MD; Comparison of Ulex europaeus I lectin and factor VIII-related antigen in vascular lesions, 1984, Arch Pathol Lab Med 108: 129-132

Okada TS; Recent progress in studies of the transdifferentiation of eye tissue in vitro, 1983, Cell Differ 13:177-183

Osborn M, Weber K; Tumor diagnosis by intermediate filaments typing: A novel tool for surgical pathology, 1983, Lab Invest 48: 372-394

Owaribe K, Kartenbeck J, Rungger-Brändle E, Franke WW; Cytoskeletons of retinal pigment epithelial cells: Interspecies differences of expression pattern indicate independence of cell function from the specific complement of cytoskeletal proteins, 1988, Cell Tiss Res 254, 301-315

Park CM, Hollenberg MJ, Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo, 1989, Dev Biol 134: 201-205

Parums DV, Cordwell JL, Micklem K, Heryet AR, Gatter KC, Mason DY; Jc 70: A new monoclonal antibody that detects vascular endothelium associated antigen on routinely processed tissue sections, 1990, J Clin Pathol 43: 752-757

Pereira MEA, Kisailus EC, Gruezo F, Kabat EA; Immunochemical studies on the combining site of blood-group H-specific lectin from Ulex europaeus, 1978, Arch Biochem Biophys 185: 108-115

Petryniak J, Goldstein IJ; Immunochemical studies on the interaction between synthetic glycoconjugates and α -L-fucosyl binding lectins, 1986, Biochemistry 25:2829-2838

Peymann GA, Blinder KJ, Paris CL; A technique for retinal pigment epithelium transplantation of age-related macular degeneration secondary to extensive subfoveal scarring, 1991, Ophthalmic Surg 22:102

Pittack C, Jones M, Teh Ta, Basic fibroblast growth factor induces retinal pigment epithelium to generate neural retina in vitro, 1991, Development 113: 577-588

Pollak OJ, Kasai T.; Appearance and behavior of aortic cells in vitro, 1964, Am J Med Sci 248: 105

Pomerat CM, Slick WC.; Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture, 1963, Nature 198: 859-

Rand JH, Sussman II, Gordon RE; Localization of factor VIII-related antigen in human vascular subendothelium, 1980, Blood 55: 752-756

Renart, J, Reiser, J, Stark, GR; Transfer of Proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: Method for studying antibody specificity and antigen structure, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 3116-3120

Ruoslahti E, Engvall E, Hayman EG; Fibronectin: current concepts of its structure and function, 1981, Coll Rel Res 1: 95

Sarks SH and Sarks JP; Age- related macular degeneration: atrophic form. In: Schachat AP, Murphy RP, Patz A, eds Volume Two Medical Retina, in Retina, SJ Ryan, ed., CV Mosby Co., St. Louis, 1989

Sarna T; Properties and function of the ocular melanin- a photobiophysical view, 1992, J Photochem and Photobiol, Biol, 12:215-58

Schmechel DE, Marangos PJ, Brightman M, Goodwin FK; Brain enolases as specific markers of neuronal and glial cells, 1978, Science 199: 313-315

Schmid E, Tapscott S, Bennett GS, Croop J, Fellini SA, Holtzer H, Franke WW; 1979, Differentiation 15:27-40

Schweigerer L, Malerstein B, Neufeld G, Gospodarowicz D; Basic fibroblast growth factor is synthesized in cultured retinal pigment epithel cells, 1987, Biochem Biophys Res Commun 143: 934-940

Shakib M, Rutkowski P, Wise GN; Fluorescein angiography and the retinal pigment epithelium, 1972, Am J Ophthalmol 74: 206-218

Shearn SAM, Peake IR, Giddings JC; The characterisation and synthesis of antigen related to factor VIII in vascular endothelium, 1977, Thromb Res 11: 43-56

Shimuzi A, Suzuki F, Kato K; Characterisation of $\alpha\alpha$, $\beta\beta$, and $\alpha\alpha$ human enolase isoenzymes, and preparation of hybrid enolases ($\alpha\beta$ and $\beta\alpha$) from homodimeric forms, 1983, Biochem Biophys Acta 748: 278-284

Sieber-Blum M, Sieber F, Yamada KM, Cellular fibronectin promotes adrenergic differentiation of quail neural crest cells in vitro, 1981, Exp Cell Res 133: 385

Smith, PK, Krohn, RI, Hermanson, GT, Mallia, AK, Gartner, FH, Provenzano, MD, Fujimoto, E K, Goetze, NM, Olson, BJ, Klenk, DC; Measurements of protein using bicinchoninic acid, 1985, Analyt. Biochem. 36, 13-18

Sobottka-Ventura A, Böhnke M, Lölliger C, Kühnl P, Winter R, Engelmann K; HLA-Typisierung von Spenderhornhäuten mit hohen post-mortem-Zeiten, 1996, *Ophthalmol*, 93: 262-267

Sorgente N, Bowersox JC; Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin, 1982, *Cancer Res* 42: 2547

Stroeva OG, Mitashov VI; Retinal pigment epithelium: Proliferation and differentiation during development and regeneration, 1983, *Int Rev Cytol* 83: 221-293

Spitznas M, Hogan MJ; Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. Interrelationship in the human eye., 1970, *Arch Ophthalmol* 84: 810-819

Spitznas, M, The fine structure of the chorioretinal border tissue of the adult human eye, 1974, *Adv. Ophthalmol.* 28: 78-174

Tapia FJ Barbosa AJ, Marangos PJ, Polak JM, Bloom SR, Dermody C; Neuron-specific-enolase is produced by neuroendocrine tumours, 1981, *Lancet* 1: 808-811

Terranova VP, Rohrbach DH, Martin GR; Role of laminin in the attachment of PAM 212 cells to basement membrane collagen, 1980, *Cell* 22: 719

Thornton SC, Mueller SM, Levine EM; Human endothelial cells: use of heparin in cloning and longterm cultivation, 1983, *Science* 222: 623-625

Timpl R, Rohde H, Gehron-Robey P, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR; Laminin- a glycoprotein of a cell-surface protein involved in PC 12 cell-substratum adhesion and neurite outgrowth on laminin and collagen, 1979, *J Biol Chem* 254, 9933-9937

Timpl R; Structure and biological activity of basement membrane proteins, 1989, *Eur J Biochem* 180: 487-502

Tso MOM, and Friedman E; The retinal pigment epithelium, 1967, I. Comparative histology. *Arch Ophthalmol* 78: 1188-1205

Tso MOM; Photic maculopathy in rhesus monkey. A light and electron microscopic study, 1973, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 12: 17

Turksen K, Aubin JE, Sodek J, Kalnins VI; Changes in distribution of laminin, fibronectin, type IV collagen and heparin sulfate during colony formation by chick retinal pigment epithelial cells in vitro, 1984, *Collagen Rel Res* 4: 413-426

Turksen K, Opas M, Kalnins V; Cytoskeleton, adhesion, and extracellular matrix of fetal human retinal pigmented epithelial cells in culture, 1989, *Ophthalmic Res* 21: 56-66

Turner RR, Bechstead JH, Warnke RA; Endothelial cell phenotypic diversity, 1987, *Am J Pathol* 87:569-575

Usher CH; A note on the choroid at the macular region, 1906, *Trans, Ophthalmol. Soc. U.K.* 26: 107-110

Vinores SA, Herman MM, Hackett SF, Campochiaro PA; A morphological and immunohistochemical study of human retinal pigment epithelial cells, retinal glia, and fibroblasts grown on Gelfoam matrix in an organ culture system. A comparison of structural and nonstructural proteins and their application to cell type identification, 1993, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231:279-288

Vinores, SA, Derevjanik NL, Mahlow, J, Hackett, SF, Haller, JA, DeJuan, E, Frankfurter, A, Campochiaro PA; Class III beta-tubulin in human retinal pigment epithelial cells in culture and in epiretinal membranes, 1995, *Exp. Eye Res.*14:384-400

Virtanen I, Letho VP, Lehtonen E, Vartio T, Stenman S, Kurki P, Wagner O, Small JV, Dahl D, Badley RA; Expression of intermediate filaments in cultured cells, 1981, *J Cell Sci* 50: 45-63

Vlodavsky I, Greenburg G, Johnson LK, Gospodarowicz D; Vascular endothelial cells maintained in the absence of FGF undergo structural and functional alterations that are incompatible with their in vivo differentiated properties, 1979, *J Cell Biol* 83:468

Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ; Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells, 1982, *J Cell Biol* 95: 355-360

Wallow IHL and Tso MOM; Proliferation of the retinal pigment epithelium over malignant choroidal tumors, 1972, *Am J Ophthalmol* 73:914-926

Weibel ER, Palade GE; New cytoplasmic components in arterial endothelia, 1964, *J Cell Biol* 23:101-112

Wolff E; Can the network formed by retinal pigment epithelium be seen by the ophthalmoscope?, 1938 *Proc. R. Soc. Med.* 31:1104

Wu KK, Thiagarajan P; Role of endothelium in thrombosis and hemostasis, 1996, *Annu Rev Med* 47: 315-331

Yamada T, Shirakawa H, Okada M, Yoshimura N, Matsumura M, Ogino N; Retinal pigment epithelial cells produce fibronectin, *Ophthalmic Res*, 1989, 19:338-43

Yamakawa R, Shirakawa H, Okada M, Yoshimura N, Matsumura M, Ogino N; Retinal pigment epithelial cells produce fibronectin, 1987, *Ophthalmic Res*. 19:338-43

Young RW, Pathophysiology of age-related macular degeneration, 1987, *Surv Ophthalmol* 31:291

Zhao S, Rizzolo LJ, Barnstable CJ.; Differentiation and transdifferentiation of the retinal pigment epithelium, 1997, *Int Rev Cytol* 171: 225-266

Zhou Y, Opas M; Cell shape, intracellular pH, and fibroblast growth factor responsiveness during transdifferentiation of retinal pigment epithelium into neuroepithelium in vitro, 1994, *Biochem Cell Biol* 72:257-265

Lebenslauf

Name: Annett Richel
Kegelhofstraße 16
20251 Hamburg
Tel.: 040 - 46960474

Geburtsdaten: 15. August 1972, Rostock, Mecklenburg-Vorpommern

Eltern: Herr Dr. med. dent. Siegfried Richel, Zahnarzt
Frau Dr. med. Heidi Richel, Augenärztin

Geschwister: Susan Richel, 20 Jahre alt, Studentin der Zahnmedizin

Ausbildung: 1979-1987 Polytechnische Grund- und Oberschule in Rostock
1987-1991 Altsprachliches Gymnasium
1993-1999 Studium der Humanmedizin in Hamburg

Praktisches Jahr 1998 Augenuniversitätsklinik/ Hamburg (Augenheilkunde)
1998 Bezirksspital Frutigen/ Schweiz (Chirurgie)
1998-1999 Universitätsklinik/ Hamburg (Innere)

Beschäftigungen: 10/91-02/92 Mitarbeit in einer Arztpraxis
03/92-08/92 Krankenhauspraktikum in England
01/93-04/93 Freiwilliges Soziales 1/4 Jahr in einem Kindergarten
07/93-08/93 Chirurgisches Pflegepraktikum in Hamburg
07/94-08/94 Internistisches Pflegepraktikum in Hamburg
Extrawachen in Innerer Medizin
Extrawachen in der Notaufnahme (Chirurgie, Innere)

Famulaturen: Chirurgie Omaha, University of Nebraska, U.S.A.
Ophthalmologie Universitätsklinik, Hamburg
Pädiatrie Universitätsklinik, Hamburg

Hobbies: Lesen, Reisen, Tennis

Sprachen: Englisch (gut)
Latein (Großes Latinum)
Altgriechisch (Kenntnisse)
Russisch (Kenntnisse)