Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des
Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med Gisbert Richard

Expression von Kv1.3-Kaliumkanälen in retinalen Pigmentepithelzellen

Dissertation

zur Erlangung eines Grades des Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Amin Farah
aus Buxtehude
Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.04.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. Katrin Engelmann

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. O. Strauß

INHALTSVERZEICHNIS

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 1

2 EINLEITUNG 2

2.1 Das Auge 2

2.2 Anatomischer Aufbau des humanen Auges 4

2.2.1 Allgemeine Anatomie 4

2.2.2 Aufbau der Retina 8

2.3 Das Retinale Pigmentepithel (RPE) 10

2.3.1 Die Zellstruktur des RPE 10

2.3.2 Die allgemeine physiologische Funktion des RPE 12

2.3.3 Erkrankungen des RPE beim Menschen 15

2.4 Ionenkanäle 17

2.4.1 Klassifikation 17

2.4.2 Kaliumkanäle 18

2.4.3 Der Kv1.3-Kanal und seine Bedeutung im retinalen Pigmentepithel 28

2.5 RPE-Kultivierung 31

3 MATERIAL UND METHODEN 35

3.1 Chemikalien 35

3.1.1 Synthetische Medien und Mediensupplemente 35

3.1.2 Enzyme und Pufferlösungen 36

3.1.3 Beschichtungsproteine und allgemeine Chemikalien 36

3.1.4 Antikörper und Chemikalien zur immunhistochemischen Färbung 36

3.2 Geräte und Materialien 37

3.3 Gewinnung und Kultivierung humaner RPE-Zellen 40

3.3.1 Isolierung 40

3.3.2 In vitro-Kultivierung 41

3.4 Immunhistochemische Färbungen 43

3.4.1 Etablierung einer Färbemethode zum Nachweis von Kv 1.3 α-Untereinheiten an kryokonservierten Mäusehirnschnitten 43

3.4.2 Anwendung des etablierten Protokolls zur Färbung von humanen Paraffinschnitten des hinteren Augenabschnitts 45

3.4.3 Modifizierung der Färbemethode zum immunhistochemischen Nachweis von Kv 1.3 Untereinheiten in kultivierten RPE-Zellen 46
3.4.4 Nachweis von Kv 1.3 Untereinheiten in Kryoschnitten von kultivierten RPE-Zell-Monolayern 48

4 ERGEBNISSE 49

4.1 Entwicklung einer Färbemethode zur Darstellung von Kv1.3 Untereinheiten in kryokonservierten Mäusehirnschnitten 49

4.2 Anwendung des etablierten Protokolls zur Färbung von Paraffinschnitten humaner Hinteraugenabschnitte 53

4.3 Modifizierung der Färbemethode zur Färbung humaner kultivierter RPE-Zellen 57

4.4 Färberische Darstellung von Kv1.3-Untereinheiten in Kryoschnitten von serumfrei kultivierten RPE-Monolayern 89

5 DISKUSSION 91

5.1 Betrachtung von Material und Methode 91
5.1.1 Nachweis von Kv1.3-Kaliumkanälen in Mäusehirnschnitten 91
5.1.2 In Situ-Nachweis von Kv1.3-Kanälen in Paraffinschnitten des humanen hinteren Augenabschnitts 92
5.1.3 Nachweis von Kv1.3-Kanälen in kultivierten RPE-Zellen 93
5.1.4 Darstellung von Kv1.3-Kanälen in Kryoschnitten von kultivierten RPE-Zell-Monolayern 93

5.2 Einfluß der Kultivierungsmethode auf die Expression von Kv1.3-Untereinheiten in RPE-Zellen 94
5.2.1 Allgemeiner Einfluss der Kultivierung auf RPE-Zellen 94
5.2.2 Exprimierung von Kv1.3-Kanälen während der Kultivierung 96

5.3 Lokalisation von Kv1.3-Kanälen in RPE Zellen 99

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick 104

6 ZUSAMMENFASSUNG 106

7 LITERATURVERZEICHNIS 107

8 DANKSAGUNG 115

9 CURRICULUM VITAE 116

10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 117

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Bisher fehlen standardisierte Instrumente zur Beurteilung der Qualität von RPE-Kulturen in Bezug auf Morphologie und Funktion. Bedeutende Parameter diesbezüglich sind zum Beispiel der Ionenhaushalt, die Phagozytoseleistung oder die Zellmorphologie.

Ziel dieser Arbeit ist der immunhistochemische Nachweis von Kaliumkanälen vom Kv1.3-Typ als wichtiges regulatives Element im Ionenhaushalt retinaler Pigmentepithelzellen. Als Marker für den Differenzierungsgrad wird die Ausbildung von Kv1.3-Kanälen durch kultiviertes humanes RPE untersucht. Von spannungsabhängigen Calciumkanälen ist bekannt, dass die Art des Kultursubstrates einen Einfluss auf die Expression und die Funktionalität dieser Kanäle hat. Dargestellt wird die Expression von Kv1.3-Untereinheiten durch RPE-Zellen in vivo und in vitro. Es werden RPE-Kulturen verglichen, die unter unterschiedlichen Kulturbedingungen gezüchtet werden, wobei der Einfluss verschiedener Kultursubstrate auf den Erhalt der Zelldifferenzierung bestimmt wird. Anhand der Darstellung der Distribution von Kv1.3-Untereinheiten innerhalb retinaler Pigmentepithelzellen, sollen die bisherigen Hypothesen zur Rolle von Kv1.3-Kaliumkanälen im Ionenhaushalt dieser Zellen verifiziert werden.

2 Einleitung

2.1 Das Auge

Unsere Augen eröffnen uns den Großteil unserer Wahrnehmungen und Eindrücke, mit denen wir uns durch unser Leben bewegen. Das menschliche Auge nimmt über die Bildwahrnehmung mehr als 80% aller Informationen auf. Etwa ein Drittel des Zentralnervensystems ist mit der visuellen Wahrnehmung und deren Verarbeitung befasst.

Die Information des empfangenen Lichtes wird in der Netzhaut (Retina) über photochemische in bioelektrische Impulse umgesetzt. Als adäquater Reiz gelten elektromagnetische Wellen von ca. 400 bis 800 nm. Dabei findet die primäre Informationsverarbeitung in der okzipitalen Sehrinde statt. Hier erfolgt eine Bildmodifizierung, es wird also nicht unmittelbar das auf der Netzhaut entworfene Bild gesehen, die visuelle Wahrnehmung muss vielmehr als psychophysiologischer Vorgang gewertet werden. Damit werden die Wahrnehmungen des Gesichtssinnes von der Technik der reinen Bildübertragung abgelöst. Ein eigentlicher Bildcharakter besteht nur für die in den zentralen Partien der Netzhaut abgebildeten Gegenstände.

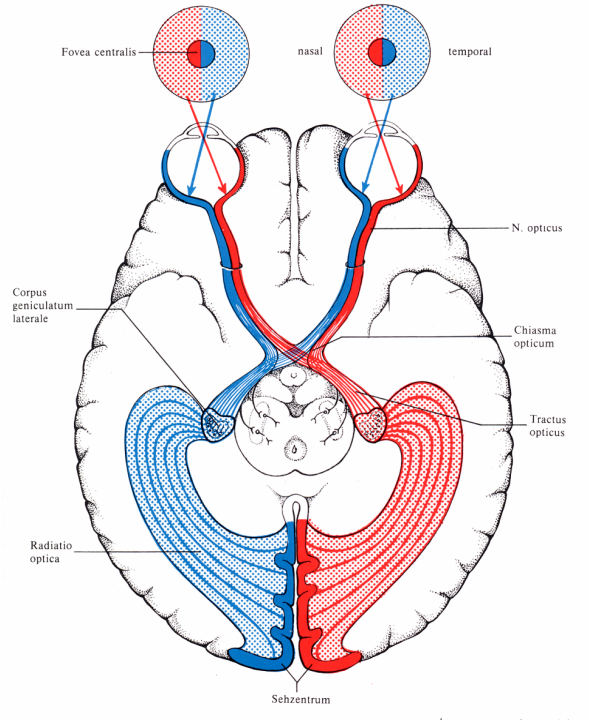


Bild 2.1: Darstellung der menschlichen Sehbahn; (Schumacher 1991)

Der Nervus opticus verfügt über etwa 1 Mio. Neuriten, die die Ganglienzellen der sensorischen Retina mit den primären Sehzentren im Corpus geniculatum laterale und der Sehrinde verbinden. Verbindungen der Sehbahn und der Sehrinde, unter anderem mit den okulomotorischen Reflexzentren, den optischen Erinnerungsfeldern, den Lese- und Sprachzentren bilden die organische Grundlage der Psychophysiologie des Sehens.

2.2 Anatomischer Aufbau des humanen Auges

2.2.1 Allgemeine Anatomie

Da die Augäpfel (Bulbi) pimär aus dem Neuralrohr und dem Ektoderm gebildet werden, sind der Nervus opticus und die Retina ontogenetisch als vorgeschobener Gehirnteil zu betrachten. Das sichtbare Licht muss, um die Netzhaut erreichen zu können, durch den optischen (lichtbrechenden) Apparat gelangen, der aus Hornhaut, Vorderkammer, Linse und Glaskörper besteht. Es wird ein verkleinertes, umgekehrtes Bild der Objekte auf die Retina projiziert. Netzhaut und Sehnerv werden als rezeptorischer (sensorischer) Apparat des Auges zusammengefaßt. Uvea, Sklera und Korneastroma lassen sich auf das Mesoderm zurückführen. Die Epithelien der Kornea und der Konjunktiva sowie die der Lider sind ektodermaler Herkunft.

Das Auge ist von einer mit Knochenhaut (Periost) ausgekleideten knöchernen Begrenzung umgeben. Die Augenhöhle (Orbita) beinhaltet einen Fettgewebskörper (Corpus adiposum orbitae), in welchem sich der Augapfel (Bulbus occuli), der Sehnerv (Nervus opticus) und die Augenmuskeln befinden. Der Bulbus wird durch vier so genannte gerade Augenmuskeln (Musculi recti) und zwei schräge Augenmuskeln (Musculi obliquii) bewegt.

Der Bulbus selbst ist von einer aus lockerem Bindegewebe bestehenden Hülle, der Tenonischen Kapsel, umgeben. Von der Periorbita ausgehend wird sie durch radiär verlaufende Bänder und Stränge gebildet. Durch ihre Verlaufsform werden diese als Retinacula bezeichnet. In ihrem vorderen Teil schließt sie die äußeren Augenmuskeln mit ein. Der hintere Teil wird in der Tiefe zusammen mit den Membranen des orbitalen Fettgewebskörpers gebildet. Als glatt ausgekleidete Halbkugel, ähnlich einem Kugelgelenk, gewährleistet sie leichte Beweglichkeit.

Zu den weiteren Anhangsgebilden des Bulbus gehören Bindehaut, Lider mit Wimpern, Augenbrauen, Lidmuskeln, Tränendrüse, ableitende Tränenwege sowie Gefäße, Nerven und Muskeln der Orbita. Sie werden einschließlich der Tenonischen Kapsel als okuläre Adnexe bezeichnet.

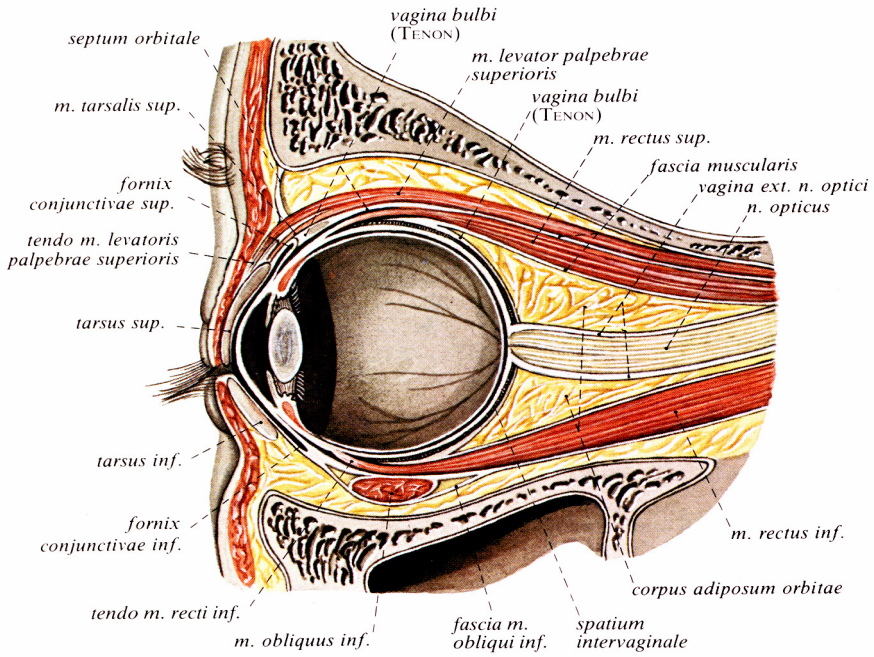


Bild 2.2: Sagittalschnitt durch die Augenhöhle; (Sobotta and Ferner 1982)

Das Auge besteht aus drei äußeren übereinander liegenden Gewebsschichten, einem fast zellfreien Innenraum mit dem lichtbrechenden Medium des Glaskörpers und der Linse. Die Funktionen der jeweiligen Gewebsschichten unterscheiden sich im vorderen und hinteren Augenabschnitt.

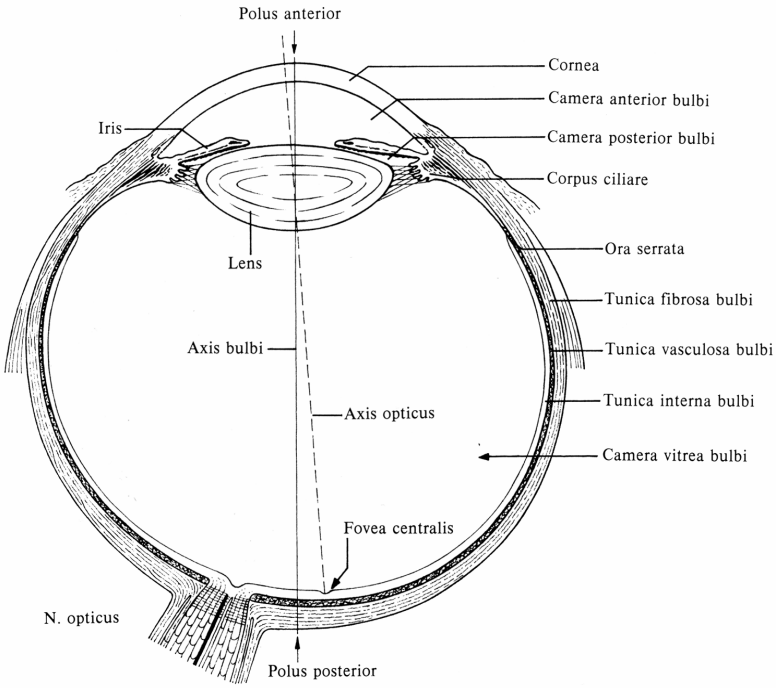


Bild 2.3: Querschnitt des Auges; (Schumacher 1991)

Die Sklera bildet zusammen mit der Hornhaut (Cornea) die erste der drei Schichten (Tunica fibrosa) des Augapfels. Sie besteht aus der Substantia propria die kollagen-elastische Fasern enthält.

Die Cornea bildet als transparenter Abschnitt der Augapfelhülle die Vorderfläche des Augapfels. Nach außen findet sich ein unverhorntes mehrschichtiges Plattenepithel von 4-6 Schichten auf einer dicken Basallamina (Bowmansche Membran). Es folgt das Stroma (Substantia propria), dass durch die Descement-Membran von dem nach innen anschließenden Endothelium getrennt wird. Die Hornhaut geht an ihrer seitlichen Grenze (Limbus corneae) in die sogenannte Lederhaut (Sklera) über.

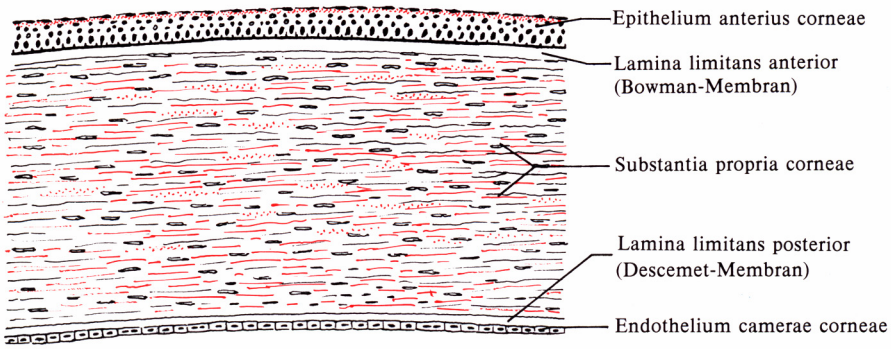


Bild 2.4: Schichten der Cornea; (Schumacher 1991)

Die mittlere Schicht (Tunica vasculosa) wird gebildet aus der Iris, dem Ziliarkörper (M.ciliaris, Ziliarfortsätze und Zonulae ciliaris) sowie der Aderhaut (Choroidea). Im hinteren Bulbiabschnitt bildet die sensorische Retina und das retinalen Pigmentepithel (RPE) die innere Gewebeschicht (Tunica interna).

Der Raum zwischen Linse und Netzhaut (camera vitrea)wird vom Glaskörper (Corpus vitreum) ausgefüllt einer gallertigen Masse mit 98%igen Wassergehalt, deren Gerüst aus kollagenen Fibrillen besteht, in deren Lücken Riesenmoleküle der Hyaluronsäure eingelagert sind. Sein Aufbau schützt und unterstützt die ihn umgebende Retina. Enthaltende extrazelluläre Metabolite und Sauerstoff spielen eine Rolle als Reservoir für den Sauerstoffaustausch mit der Retina und der Linse.

2.2.2 Aufbau der Retina

Die Netzhaut (Retina) mit ihrem typischen vielschichtigen Aufbau reicht vom Sehnervenkopf (Papille) bis zur Ora serrata. An diesen Stellen ist die Netzhaut mit der Unterlage verbunden, während sie sonst dem Pigmentephitel in lockerer Verbindung aufliegt. Der histologische Aufbau der Retina ist in Bild 2.5 dargestellt.

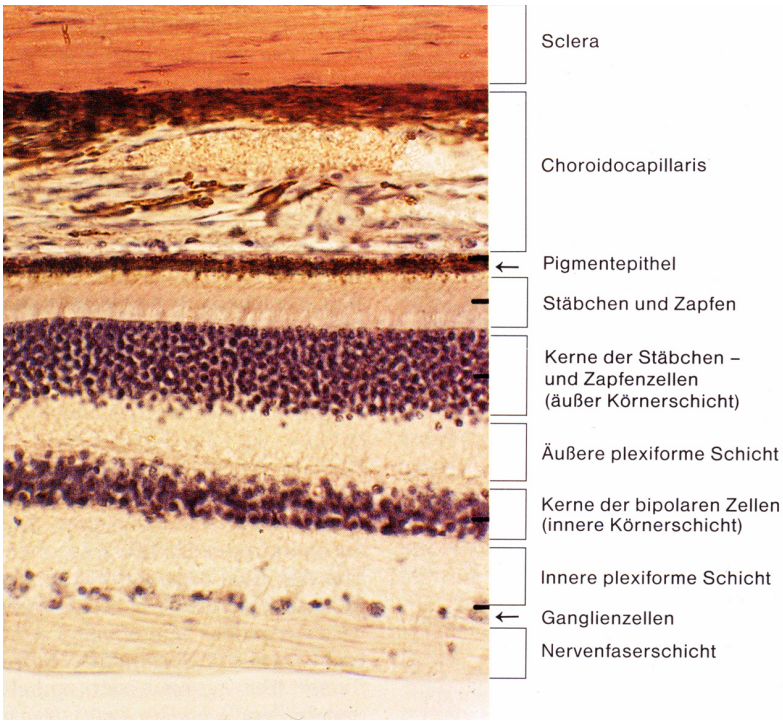


Bild 2.5: Histologisches Bild der Retina im Schnittpräparat; HE-Färbung, Vergr. 200x; (Junqueira, Carneiro et al. 1991)

Die sensorische Retina unterteilt sich in drei Neurone. Das erste Neuron besteht aus den Photorezeptoren, den Stäbchen und den Zapfen, deren Kerne die äußere Körnerschicht bilden. Das zweite Neuron setzt sich aus Bipolarzellen zusammen, die die Photorezeptoren mit den Ganglienzellen verbinden. Im histologischen Schnitt repräsentieren die Kerne der Bipolarzellen die innere Körnerschicht. Horizontalzellen und Amakrinzellen stellen eine horizontale und vertikale Vernetzung zwischen den Photorezeptoren her. Sie dienen zur Kontrastverstärkung durch laterale Inhibition und zu vielen anderen Modulationen der Signalverarbeitung. Das dritte Neuron besteht aus

Ganglienzellen, deren Axone die Nervenfasern des Nervus opticus bilden. Optische Reize werden von den Photorezeptoren der Netzhaut in elektrische Nervenimpulse umgewandelt und durch den Nervus opticus zu den primären und sekundären optischen Zentren des Zentralnervensystems weitergeleitet. Alle übrigen Augenschichten unterstützen die Funktion der neurosensorischen Retina.

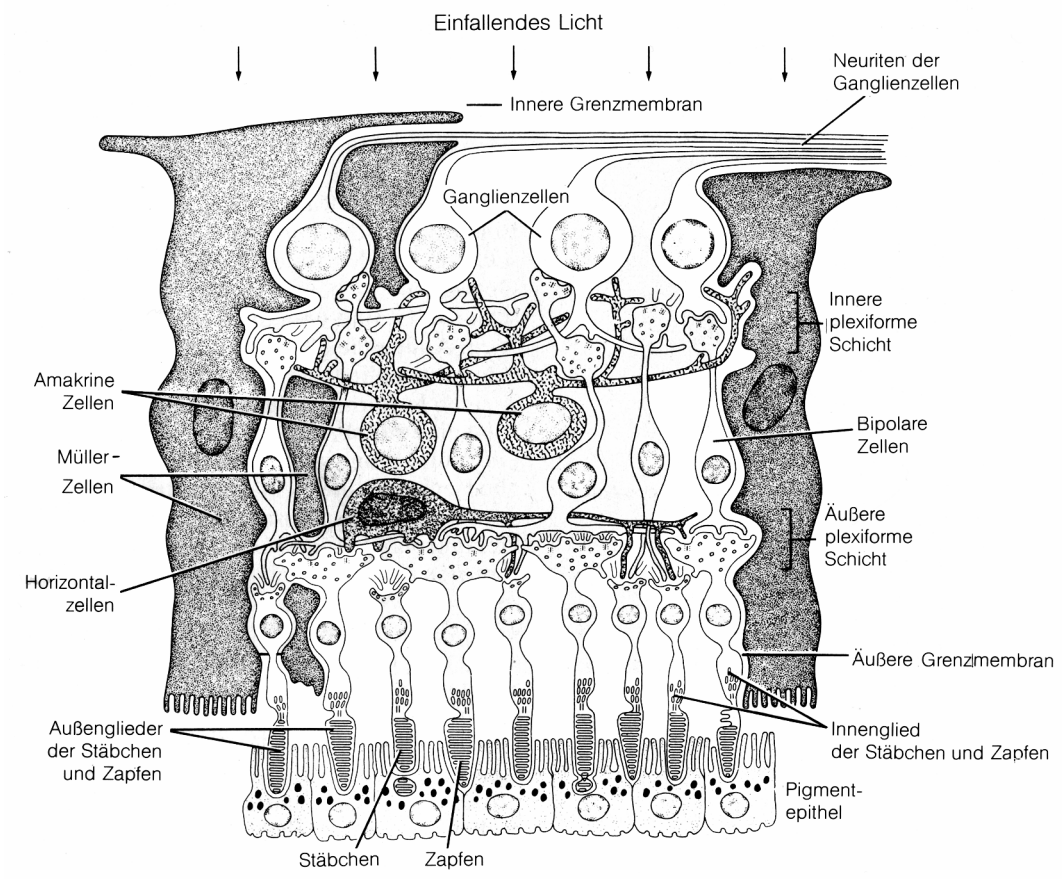


Bild 2.6: Schematische Darstellung der Retinaschichten; (Junqueira, Carneiro et al. 1991)

2.3 Das Retinale Pigmentepithel (RPE)

2.3.1 Die Zellstruktur des RPE

Das RPE ist ein polares Epithel, welches die neurosensorische Retina von der Chorioidea trennt und aus einem Monolayer hexagonaler Zellen besteht. Es erstreckt sich juxtapapillär vom Nervus opticus bis zur Ora serrata. Embryonal stammt es von der gleichen neuronalen Anlage wie die sensorische Retina, differentiert sich jedoch in ein sekretorisches Epithel. Es ist das zuerst pigmentierte Gewebe im Körper.

Die apicale Oberfläche besitzt viele lange Mikrovilli, die in den Bereich der Photorezeptorenaußensegmente hineinreichen und diese zum Teil umgreifen. Sie stellen den Kontakt zwischen Pigmentepithel und neurosensorischer Retina her. Für den Sehvorgang wichtige Sehpigmente sind als Transportproteine in gestapelten Membranscheiben in den Außensegmenten der Photorezeptoren angeordnet. Zur ständigen Erneuerung werden sie kontinuierlich in Richtung Segmentende verschoben, um dort abgeschnürt und als Membranpakete (Debris) vom RPE phagozytiert zu werden. Durch eine sigmoidale Akkumulierung wird im Laufe des Lebens das Pigment Lipofuscin angereichert. Es ist das signifizierende Alterspigment der RPE-Zelle und besteht aus Lipiden der Außensegmente. Dabei handelt es sich möglicherweise um durch Licht und Oxidation beschädigte Membranfragmente, denn durch die Interaktion in Photorezeptoren vorkommender ungesättigter Fettsäuren mit Sauerstoff kommt es zur Lipidperoxidation. Dadurch entstehen in der Zelle Schäden, die von der Zerstörung funktioneller Membranen über die Inaktivierung membranständiger Enzyme bis hin zum Zelltod führen können. Durch die Zerstörung von Lysosomen werden lytische Enzyme freigesetzt, die wiederum körpereigene Zellen zerstören. Photorezeptorenaußensegmente und RPE kommunizieren über eine hochstrukturierte

Interphotorezeptorenmatrix (IPM), die aus viskösen Sialo-Glukosaminoglykanen besteht und sowohl die apicale Seite des RPE als auch die Außensegmentoberflächen überzieht. Basale Membraneinstülpungen zur Vergrößerung der Zelloberfläche verbessern das Absorptions- und Resorptionspotential. Die laterale Seite ist glatt mit nur einigen Zelldigitationen, während tight junctions (zonula occludens) im seitlich-apicalen Zellverlauf die freie Passage von Wasser und Ionen verhindern. Diese Verbindung bildet zusammen mit dem Endothelium der choroidalen Kapillargefäße die Blut-Retina-Barriere. Basolateral stehen die Zellen des RPE über gap junctions miteinander in Kontakt. Weiterhin bilden desmosomale Verbindungen eine zonula adhaerens. Apical liegende Melaninpigmente, so genannte Melanosomen, sind für die typische Braunfärbung und die hieraus resultierende Namensgebung verantwortlich. Die Rolle des Melanins bleibt jedoch spekulativ. Innerhalb des Auges minimiert es entstandenes Streulicht, bindet Toxine und stabilisiert freie Radikale. Die Photorezeptorendichte variiert entlang der Retina, hat jedoch gegenüber dem darunter liegenden retinalen Pigmentepithel eine physiologische Konstanz. Die apicale Seite des RPE grenzt durchschnittlich an 45 Photorezeptoren pro Zelle, während im basalen Anteil der Zellkern zu finden ist. Der Monolayer liegt der pentalaminaren Bruch´schen Menbran an und trennt das RPE von der Choriokapillaris.

Die Zellen des RPE können als postmitotisches Gewebe keine Zellerneuerung durch Zellteilung erfahren. Durch einen internen Erneuerungsvorgang, der Autophagie, werden Zellorganellen regelmäßig regeneriert.

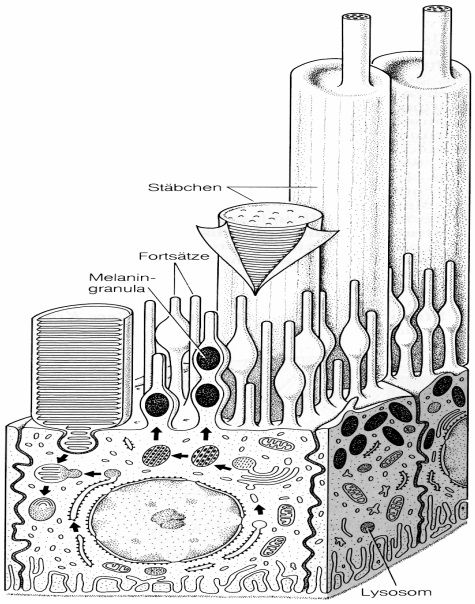


Bild 2.7: RPE-Zelle mit Rezeptoraußensegmenten und Phagozytoseprozess; (Junqueira, Carneiro et al. 1991)

2.3.2 Die allgemeine physiologische Funktion des RPE

Die metabolische und protektive Funktion des retinalen Pigmentepithels gewährleistet den Erhalt von Vitalität und Funktionalität der äußeren avaskulären neurosensorischen Retina. Viele dieser metabolischen Funktionen werden erst durch die große Vielfalt membranständiger Rezeptoren und Ionenkanäle ermöglicht. Die wesentlichen Funktionen werden in einer Übersicht von Strauss folgendermaßen zusammengefasst (Strauss 2005), Bild 2.8:

- Lichtabsorption
- Epithelialer Transport
- Gliafunktion
- Phagozytose
- Lichtzyklus
- Sekretion

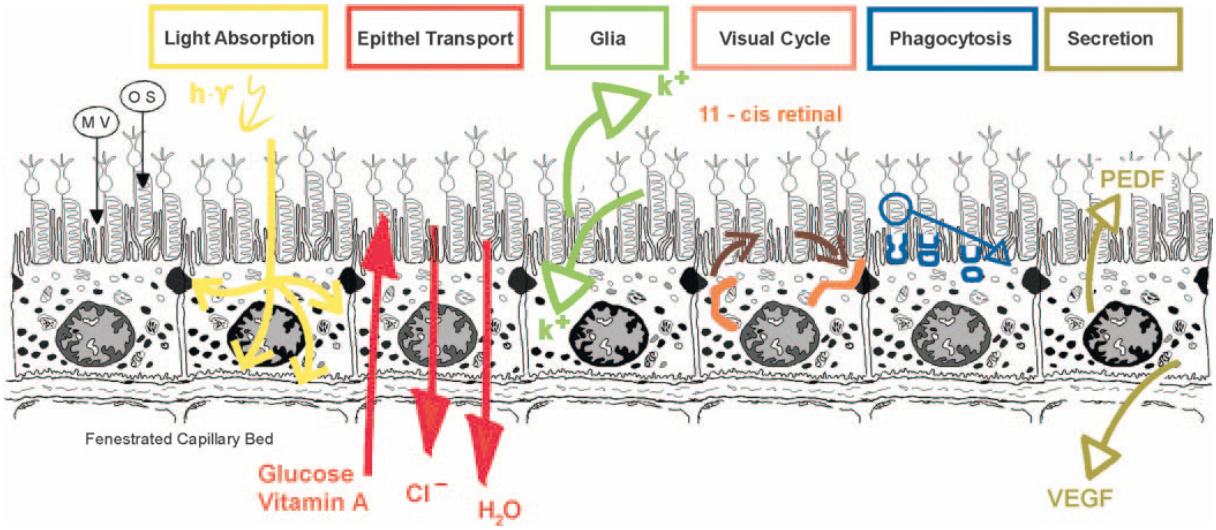


Bild 2.8: Zusammenfassung elementarer Funktionen des RPE; VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, PEDF = pigmentepithelialer Wachstumsfaktor, OS = Outer Segments, MV = Microvilli; aus (Strauss 2005)

Die optische Funktion der RPE-Zelle bezüglich der Pigmentierung besteht in der Reduktion von Streustrahlen und der Absorption von Lichtenergie. Gleichzeitig wirkt das RPE als Barriere gegen exzessiven Lichteinfall durch die Sklera.

Tight-junctions verbinden die RPE-Zellen und dienen dem Schutze der neuronalen Umwelt der Retina. Ein intensiver Austausch von Ionen und Wasser zwischen dem Subretinalraum und der Choroidea findet ausschließlich über das Zellinnere der RPE-Zellen statt. Zu diesem Zweck weist das RPE eine morphologische und funktionelle Polarität auf.

Durch die Aktivität der Photorezeptoren werden anfallende Veränderungen der Ionenzusammensetzung im subretinalen Spalt kompensiert (Strauss 2005). Weiterhin wird durch eine Dehydratation des subretinalen Raums die Adhäsion zwischen RPE und Retina unterstützt (Hughes and Takahira 1998). Der starke Einfluss der metabolischen Aktivität in Abhängigkeit zum Wassertransport entlang des RPE ist maßgebend für die retinale Adhäsion. Passive Einflüsse wie die des Glaskörpers, des intraokularen Flüssigkeitsdrucks oder des choroidalosmotischen Drucks tragen zum

komplexen Prozess der retinalen Positionierung bei. Ein weiteres Kriterium der Adhäsion ist der Einfluss des RPE auf die Bildung und Instandsetzung der für den Stoffwechselaustausch verantwortlichen Interphotorezeptorenmatrix (IPM). Die Bindungseigenschaft und die Viskosität der IPM sind vom umgebenden Wasser- und Ionenhaushalt abhängig, deren metabolische Kontrolle dem RPE unterliegt. Grundsätzlich werden Wasser und Ionen über apical und basal liegende Transportsysteme in jede Richtung befördert; in der Summe jedoch kommt es zu einer Retinal-Choroidalen Wasserbewegung. Darüber hinaus ist das Pigmentepithel am retinoiden Zyklus beteiligt, zu dem die Synthese und Speicherung von Retinylestern, die Isomerisierung von all-trans-Retinoiden zu 11-cis-Retinoiden, die Umwandlung von Retinol zu Retinal und der interzelluläre Retinoidtransport zwischen RPE-Zelle und Photorezeptoren gehören (Flood, Bridges et al. 1983; Flannery, O'Day et al. 1990). Vitamin A (Retinol) hat hierbei neben der Bildung von Rhodopsin auch die Funktion eines Wachstumsfaktors. RPE Zellen besitzen einen hohen Anteil an Mitochondrien und sind an vielen oxidativen Prozessen beteiligt. Die Phagozytose von fortlaufend abgeschilferten Membranscheiben der Photorezeptorenaußensegmente stellt eine wichtige metabolische Funktion des RPE dar (Spitznas and Hogan 1970; Feeney 1973; Karl, Valtink et al. 2006). Besonders energiereiches blaues Licht initiiert die Bildung von reaktiven Sauerstoffmolekülen und Radikalen. Durch die kontinuierliche Aussetzung von freien Elektronen, die insbesondere mit Molekülen mit Doppelbindungen (z.B. ungesättigte Fettsäuren der Außensegmentmembranen) schnell reagieren, sind die Photorezeptoren für derartig schädigende Prozesse ein begünstigendes Umfeld. Durch diese Einflüsse akkumulieren laufend defekte Proteine, Lipide und toxische Substanzen in den Rezeptoraußensegmenten. Um die Funktion aufrecht zu erhalten unterliegen die Außensegmente einer ständigen Erneuerung, während die verbrauchten Anteile abgeschilfert werden. Es müssen täglich über 100 Membranscheiben pro Photorezeptor erneuert werden. Nach der Phagozytose durch

das RPE erfolgt die Einkapselung in Phagosomen (siehe Bild 2.7). Anschließend wird der so genannte Membrandebris lysosomal abgebaut, wodurch die beim Sehvorgang entstandenen Stoffwechselprodukte entsorgt werden. Eine weitere essentielle Funktion des RPE ist die Sekretion von auto- und parakrinen Botenstoffen. Dies sind Wachstumsfaktoren und Signaltransmitter, die dem Erhalt struktureller Integrität dienen, die Ausbildung eines immunprivilegierten subretinalen Raums gewährleisten und an anderen physiologischen Prozessen beteiligt sind.

2.3.3 Erkrankungen des RPE beim Menschen

Durch die große Bedeutung in der Regulation des metabolischen Stoffwechsels besteht bei einer Erkrankung des RPE immer ein Bezug zur Retina und Choroidea. So führen eine Reihe angeborener oder erworbener Erkrankungen des RPE immer auch zu einer Erkrankung der nichtregenerativen Photorezeptoren. Grund und klinischer Verlauf der degenerativen Netzhauterkrankungen variieren, meist kommt es zu einem kontinuierlichen Untergang von Photorezeptoren, was zu einer Verschlechterung des Sehvermögens bis hin zu einer Erblindung führen kann. Zu den angeborenen Erkrankungen gehören die Retinopathia pigmentosa mit ihren zahlreichen Unterformen und die Atrophia gyrata und zu den erworbenen Retinopathien die altersbedingte Makuladegeneration (AMD). Die altersbedingte Makuladegeneration ist die häufigste Ursache für einen erheblichen Visusverlust in der westlichen Welt. Die Pathogenese der AMD ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Es handelt sich um eine komplexe multifaktorielle Erkrankung, die sich unter anderem durch eine bilaterale Symmetrie auszeichnet, was auf genetische Einflüsse bei dieser Erkrankung hinweist (Pauleikhoff, van Kuijk et al. 2001). Dies wird unterstützt durch Untersuchungen über die familiäre Prädisposition einer AMD und Studien bei Zwillingen, die eine deutliche Übereinstimmung der Inzidenz und der Manifestationsformen belegen (Heiba, Elston et al. 1994). So wurden z.B. verschiedene Mutationen des Peripherin/RDS-Gens

gefunden, welches sowohl in Zapfen als auch in Stäbchen exprimiert wird (Wells, Wroblewski et al. 1993). Es wurde deutlich, dass eine Vielzahl dieser Mutationen Variationen von Krankheitsbildern hervorruft, die eine eindeutige Klassifikation der Pathogenese erschweren. Bei AMD wird ein altersbedingter Funktionsverlust der RPE-Zellen mit sekundärem Photorezeptorenuntergang und Degeneration der Choroidea zu Grunde gelegt (Young 1987; Pauleikhoff, van Kuijk et al. 2001). Eine Schädigung des retinalen Pigmentepithels führt zu einer Atrophie der Choriokapillaris und der Bruch`schen Membran. Darüber hinaus resultiert eine Anhäufung von Membrandebris im subretinalen Spalt durch unvollständige oder fehlende Phagozytose. Dies hat den Untergang angrenzender Photorezeptoren zur Folge. Histopathologisch umfasst diese Degeneration die geographische Atrophie des RPE, die Pegmentepithelabhebung, die choroidale Neovaskularisation und in den Endstadien die fibrovaskuläre Vernarbung. Die Inzidenz steigt rascher als die Alterspyramide erwarten lässt. Der Visusverlust der Patienten verstärkt sich durch auftretende Neovaskularisationen mit subretinalen Hämorragien und Exudationen, die zur RPE- und/oder Netzhautabhebung führen. Neben der genetischen Disposition als Grundlage, spielen aber auch spezifische Umweltfaktoren eine Rolle. Eine Zunahme der Inzidenz der AMD wird in den letzten Jahrzehnten immer mehr im Zusammenhang mit einer Veränderung der Ernährungsgewohnheiten beschrieben. Da das über die Nahrung aufgenommene makuläre Pigment, bestehend aus Lutein und Zeaxanthin, einen filternden Effekt und eine direkte antioxidative Wirkung aufweist, kann es protektiv wirken und in der zentralen Netzhaut oxidative Lichtschäden reduzieren, insbesondere in den Außensegmenten der Photorezeptoren. Auch Vitamin E wirkt diesem Prozeß als Radikalfänger und Oxidationshemmer entgegen. Die sogenannten Karotenoide Lutein und Zeaxanthin können vom Organismus nicht selbst synthetisiert werden, sie müssen exogen über Nahrung aufgenommen werden und können somit bei Mangelaufnahme

beeinflussender Risikofaktor für die Entstehung einer AMD sein (Pauleikhoff, van Kuijk et al. 2001).

Pathogenetisch wird dem Sonnenlicht eine wesentliche Bedeutung für die Alterungsprozesse der zentralen Netzhaut zugesprochen. Eine vermehrte Exposition wird mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer AMD in Zusammenhang gebracht (Cruickshanks, Klein et al. 2001).

2.4 Ionenkanäle

2.4.1 Klassifikation

Ionen können eine Doppellipidschicht so gut wie gar nicht durchdringen, da Ihre Ladung und ihre große Hydratationshülle ihre Löslichkeit in der Kohlenwasserstoffphase der Doppellipidschicht verhindern. Der Durchtritt von polaren Molekülen durch die Zellmembran kann daher durch Diffusion nur sehr langsam erfolgen. Der Transport geladener Moleküle durch die Zellmembran wird deshalb durch spezielle Membranproteine ermöglicht, die als Membrantransport-Proteine bezeichnet werden. Man unterscheidet zwei Hauptklassen dieser Proteine: Carrier-Proteine und Kanal-Proteine.

Carrier binden das zu transportierende Substrat und befördern dieses mit Hilfe einer oder mehrerer Konformationsänderung(en) durch die Zellmembran. Kanalproteine formieren einen hydrophilen Porus durch die Doppellipidschicht. Sind derartige Poren geöffnet, ermöglichen sie spezifisch den Durchtritt von polaren Molekülen (gewöhnlich anorganische Ionen passender Größe und Ladung) durch die Membran. Kanalproteine, die auf den Transport anorganischer Ionen spezialisiert sind, werden Ionenkanäle genannt. Eine aktive Beförderung über Kanalproteine ist nicht möglich, daher erfolgt

der Moleküldurchtritt passiv entlang eines Konzentrationsgefälles. Eine Regulation wird dabei durch die Steuerung der Kanalleitfähigkeit erreicht.

Die Durchtrittskapazität und –geschwindigkeit ist bei diesem Transportmechanismus um ein Vielfaches höher als bei dem Carriermodell. Ionenkanäle werden nach dem Mechanismus zur Steurerung ihrer Durchlässigkeit weiter unterteilt in:

- Spannugskontrollierte Kanäle
- Mechanischkontrollierte Kanäle
- Ligandenkontrollierte Kanäle

Den adäquaten Reiz stellt hierbei eine Spannungsänderung an der Membran, eine mechanische Belastung (z.B. Druckerhöhung) oder die Bindung eines Signalmoleküls dar.

2.4.2 Kaliumkanäle

Kaliumkanäle sind entwicklungsgeschichtlich als alt einzustufen. Das Genom nahezu aller Lebewesen beinhaltet mindestens ein Kaliumkanal-Gen. Kein anderer Ionenkanaltyp kommt derart ubiquitär vor. Die Tatsache, dass Kaliumkanäle die einzigen Mitglieder der „S4-Superfamilie“ sind, die nicht ausschließlich in Eukaryonten vorkommen, lässt vermuten, dass alle anderen elektrische Signale übertragenden Ionenkanäle dieser Gruppe sich aus dem Kaliumkanaltyp entwickelten (Miller 2000). Kaliumkanäle erfüllen in erregbaren und nicht erregbaren Zellen wesentliche funktionelle Aufgaben. Eine wichtige Rolle spielen sie z.B. bei der Neurotransmitter- und Insulinfreisetzung, der Herzfunktion, der neuronalen Erregbarkeit, dem epithelialen Elektrolyttransport, der Kontraktion glatter Muskulatur oder der Regulation des Zellvolumens. Sie gewährleisten die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials und die Repolarisation depolarisierter Zellmembranen. Kaliumkanäle sind integrale Membranproteine, die selektiv Kaliumionen mit Raten von 106 – 108 Ionen/s entlang

eines Konzentrationsgefälles durch die Membran leiten (Hille 1992). Ein Kaliumionentransport erfolgt in der Regel von innen nach außen, da die intrazelluläre Konzentration an Kaliumionen um ein Vielfaches größer ist, als die extrazelluläre Konzentration. Mit Hilfe eines gating-Mechanismus ist ein Öffnen und Schließen der Kanalpore durch eine Konformationsänderung möglich. Bestimmte Molekülstrukturen ermöglichen die selektive Filterung des Ionendurchflusses, so dass die Kanäle eine hohe Spezifität für Kaliumionen aufweisen. Durch die Bindung weiterer Moleküle im Zellinneren an die Kanalproteine, kann eine zusätzliche Steuerung der Funktion oder Expression erfolgen.

Charakteristische Grundstruktur

Miller unterteilt zwei Hauptklassen von Kaliumkanälen, die sich durch ihre transmembranen Segmente definieren (Miller 2000). Ein funktionstüchtiger Kanal ist aus vier α-Untereinheiten aufgebaut, die sich zu einem Tetramer zusammenschließen. Die Unterschiede zwischen den zwei Hauptklassen liegen in der Topologie der transmembranen Segmente, die eine α-Untereinheit bilden:

- eine aus sechs (S1-S6) transmembranen Segmenten (Helices) bestehende Untereinheit
- eine aus zwei (M1-M2) transmembranen Segmenten bestehende Untereinheit

Die spannungsabhängigen (voltage gated) Kaliumkanäle (Kv), die calciumabhängigen Kaliumkanäle (KCa) und die KCNQ Kanäle sind aus α-Untereinheiten vom 1. Typ aufgebaut, während die einwärts gleichrichtenden (inward rectifier) Kaliumkanäle zur 2. Hauptklasse zugeordnet werden.

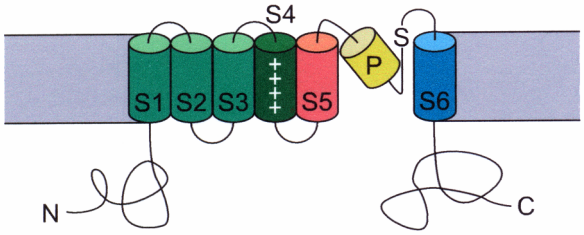


Bild 2.9: Schematische Darstellung einer α-Untereinheit der ersten Hauptklasse; transmembrane Helices sind nummeriert S1-S6; P = P-Schleife; N = Aminoterminus; C = Carboxylterminus; S = Signatursequenz; (Miller 2000)

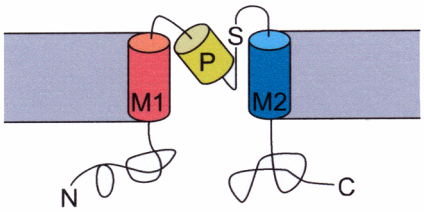


Bild 2.10: Schematische Darstellung einer α-Untereinheit der zweiten Hauptklasse; transmembrane Helices sind nummeriert M1, M2; P = P-Schleife; N = Aminoterminus; C = Carboxylterminus; S = Signatursequenz; (Miller 2000)

Alle Kaliumkanäle besitzen als gemeinsames Merkmal einen strukturellen Kern, bestehend aus zwei transmembranen Helices (S5 & S6), die durch eine porenüberspannende Schleife (P-Schleife) miteinander verbunden sind. Die P-Schleife trägt die Signatursequenz und formt mit der der terminalen Carboxylgruppe am nächsten stehenden transmembranen Helix die innere Auskleidung der Kanalpore. Beide sind somit für die Selektivität verantwortlich (Miller 2000). Ein weiteres allgemeines Strukturmerkmal der Kaliumkanäle sind die intrazellulär liegenden N- und C-Termini des Kanalproteins.

Spannungsabhängige Kaliumkanäle

Die ersten Erkenntnisse über die Molekularbiologie von Kaliumkanälen erhielt man bei Untersuchungen an Drosophila Melanogaster. Es wurden Fliegen beobachtet, die unter Ether-Anästhesie Beine, Flügel und Abdomen schüttelten (Salkoff 1986). Weitere Untersuchungen ergaben, dass dieser Phänotyp aus einer Mutation in einem Gen resultiert, welches für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal codiert (Pinto and Klumpp 1998). Dieses mutierte Gen wurde als Shaker-Gen bezeichnet. Die Fehlfunktion des betroffenen Kaliumkanals äußert sich in einem gestörten A-Strom, sodass nach einer Depolarisation neuronaler Zellen eine Repolarisation durch einen schnellen Kaliumausstrom ausbleibt. Verschiedene Arbeitsgruppen haben cDNS Klone von dem Shakerlokus isoliert und charakterisiert. Der Verwandtschaftsgrad der unterschiedlichen Klone konnte als sehr hoch eingestuft werden und ergibt sich aus einem alternativen Splicen der mRNS (Pinto and Klumpp 1998). Weitere, an Drosophila entdeckte Genloci, die für spannungsabhängige Kaliumkanäle codieren, erhielten die Bezeichnung Shab, Shaw und Shal. Alle Kanalsubtypen, die eine Homologie zu denen der Drosophila aufweisen, werden nach Chandy (Chandy 1991) einer Familie zugeordnet. Dabei werden alle Shakerhomologen mit Kv1.x (x=1-7) bezeichnet. Kv 2.x wird der Shab-, Kv 3.x der Shaw- und Kv 4.x der Shal-Unterfamile zugeordnet.

Das strukturelle Hauptmerkmal der α-Untereinheit im spannungsabhängigen Kaliumkanal sind die sechs transmembranen Helices S1-S6. S4 fungiert als Spannungssensor, während S5 und S6 an der Bildung der Kanalpore beteiligt sind, eine P-Schleife zwischen S5 und S6 trägt die Signatursequenz. Die N- und C-Termini ragen ins Zellinnere.

Die ersten 20 Aminosäuren des N-Terminus formen einen Peptidball, der als Inaktivator fungieren kann, indem er die Pore verstopft (siehe Bild 2.11). Der Rezeptor für die Inaktivierung befindet sich an S4 und S5 (Hoshi, Zagotta et al. 1990). Weiterhin ist ein Teil des Stickstoffendes für die Tetramerisierung von α-Untereinheiten notwendig.

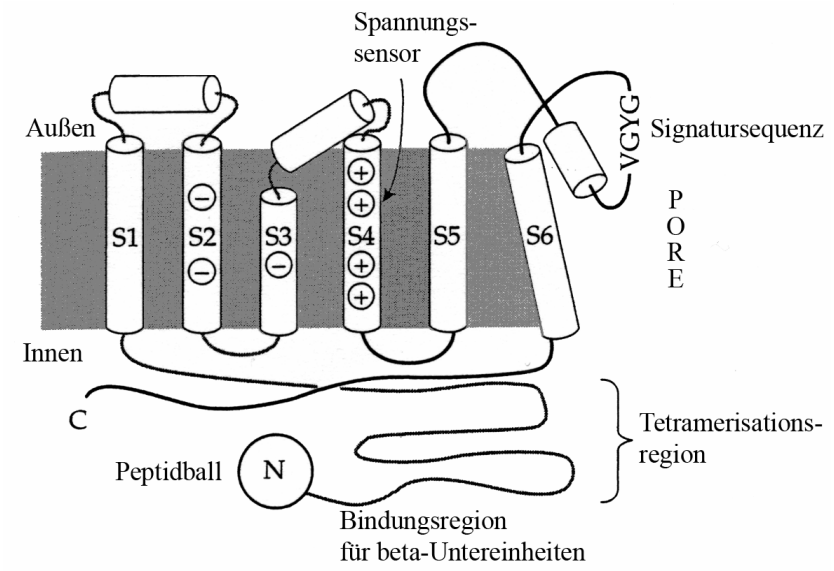


Bild 2.11: Schematische Darstellung einer α-Untereinheit eines Shaker-Kanals mit sechs transmembranen Helices S1-S6; N = Aminoterminus mit Peptidball, C = Caboxylterminus: (Hille 2001)

Weitere zytoplasmatische Strukturen können durch Bindung an die porenformenden Elemente Einfluss auf Funktion und Expression der Kanäle nehmen. So sind z.B. β-Untereinheiten bekannt (Kvβ 1-3) (Pongs, Leicher et al. 1999), die an das N-terminale Ende der α-Untereinheit binden können (siehe Bild 2.11). Dabei ist jeweils eine α-Untereinheit mit einer β-Untereinheit assoziiert, ein kompletter Kanal hat dementsprechend vier β-Untereinheiten. Nicht alle Kombinationen von α- und β-Untereinheiten sind möglich. Die β_1-Untereinheit ist z.B. nur an α-Untereinheiten der Kv1-Familie assoziierbar (Sewing, Roeper et al. 1996). Eine Coexpression einer der verschiedenen β-Untereinheiten mit kompatiblen α-Untereinheiten führt zu einer Steigerung der

Amplitude des K^+-Stromes. Dies erklärt sich aus einer größeren Dichte von membranständigen K^+-Kanälen, induziert durch die gleichzeitige Expression von β-Untereinheiten (Shi, Nakahira et al. 1996). Einige K^+-Kanäle aus der Kv1-Familie werden durch β1-Untereinheiten in ihrem Inaktivierungsverhalten beeinflusst. So vergrößert die Coexpression von β_1-Untereinheiten mit Kv1.1 α-Untereinheiten die Inaktivierungsrate der Kanäle (Rettig, Heinemann et al. 1994). Die β_1-Untereinheit kann bei Coexpression mit Kv1.5 Kanälen deren fehlenden Peptidball ersetzen und so dessen Inaktivierung beschleunigen (Hille 2001).

Weiterhin können β-Untereinheiten die Toxinsensivität von Kaliumkanälen beeinflussen. Ca^{2+}-abhängige Kaliumkanäle vom BK Typ (sehr hohe K^+-Leitfähigkeit) reagieren in der Regel empfindlich auf die Toxine Charybdotoxin und Iberiotoxin. Hirnständige BK-Kanäle werden jedoch nicht von normalen Toxindosen beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass die in Hirngewebe vermehrt exprimierte β_4-Untereinheit die Toxinsensitivität des BK-Kanals erniedrigt und weitaus höhere Toxindosen für eine Kanalblockade benötigt werden (Meera, Wallner et al. 2000).

Das Protein KChaP (K^+-Channel activating Protein) wurde als ein weiterer Modulator beschrieben (Wible, Yang et al. 1998). Die Bindung erfolgt an das N-terminale Ende einiger Kv-α-Untereinheiten. KChaP steigert beispielsweise die Amplitude von Kv1.3 Strömen in Xenopus Oocyten, ohne dass die Kinetik oder Spannungsabhängigkeit der Känale verändert wird. KChaP scheint jedoch nicht auf der Transkriptionsebene zu wirken, da durch eine Blockierung der Transkription mit Actinomycin D die Verstärkung der Kv1.3-Ströme nicht beeinflusst werden konnte (Kuryshev, Gudz et al. 2000).

Die funktionelle Diversität von spannungsabhängigen K^+-Kanälen wird außerdem durch die Fähigkeit zur Bildung von Hetero-Oligomeren vergrößert. So kann z.B. Kv1.1 mit Kv1.2 und Kv1.5 zu einem funktionierenden Kanal polymerisieren (Christie, North et al.

1990). Nicht alle Kombinationen sind möglich, Kv1.1 kann beispielsweise keine Bindung zu Kv1.4 eingehen. Die Kombinationsmöglichkeiten werden durch die aus 114 Aminosäuren bestehende Tetramerisationsdomäne bestimmt, an der der Zusammenschluss von α-Untereinheiten erfolgt (siehe Bild 2.11).

Die Molekularstruktur

1998 wurde erstmalig die Röntgenstrukturanalyse eines K^+-Kanals, des KcsA, isoliert aus dem Bakterium Streptomyces lividans, vorgestellt (Doyle, Morais Cabral et al. 1998). Obwohl die α-Untereinheit von KcsA aus nur zwei über eine P-Schleife verbundenen transmembranen Segmenten besteht, ist ihre Aminosäurensequenz der von spannungsabhängigen K^+-Kanälen sehr ähnlich. Insbesondere im Bereich der Porenregion sind die Sequenzen fast identisch.

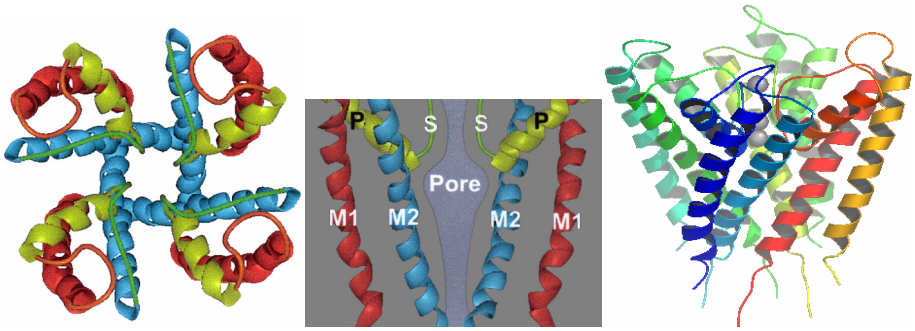


Bild 2.12: Molekularstruktur des KcsA-Kanals isoliert aus streptomyces lividans; Links: Ansicht von Oben, Mitte: Ansicht von vorne; Rechts: dreidimensionale Ansicht von vorne; Transmembrane Helices M1/M2; P = P-Schleife mit S = Signatursequenz, aus (Miller 2000)

Die 4 α-Untereinheiten, die symmetrisch um eine zentrale Pore angeordnet sind, bestehen aus jeweils zwei transmembranen α-Helices (M1 und M2), die durch eine Aminosäurekette verbunden sind. Das Lumen des so gebildeten Tunnels nimmt von extrazellulär nach intrazellullär im Durchmesser ab. Die P-Schleife beinhaltet die K^+-Signatursequenz und formt damit den Selektivitätsfilter in der Nähe der Membranaußenseite (siehe Bild 2.12). Unterhalb des Selektivitätsfilters befindet sich

eine Kavität mit einem Durchmesser von ungefähr 10 Å. Die Carboxylenden der Aminosäuren der porenformenden Helices ragen hier in die Kavität hinein. Die Zentralkavität ist durch einen wassergefüllten Tunnel mit einer Länge von 18 Å mit dem Intrazellularraum verbunden. Die Gesamtlänge der Pore beträgt 45 Å. Zu erwähnen ist jedoch, dass nicht die gesamte Pore in der Röntgenstrukturanalyse von Doyle erfasst wurde, sondern nur die Aminosäurenreste von 23-119, die den intramembranen Anteil bilden. Es fehlen die 22 cytoplasmatischen N-terminalen und die 41 cytoplasmatischen C-terminalen Reste der Aminosäurekette.

Kanalaktivierung

Eine Membrandepolarisation ist der adäquate Reiz zur Öffnung eines spannungsabhängigen K^+-Kanals. Der Spannungssensor ist das S4-Segment der α-Untereinheit (Papazian, Timpe et al. 1991). Es enthält vier bis acht positiv geladene basische Aminosäurereste (Arginin oder Lysin), die jeweils durch zwei hydrophobe Reste voneinander getrennt sind. Die dem Extrazellularraum am nächsten gelegenen ersten vier Aminosäurereste, haben im geschlossenen Zustand Verbindung zum intrazellulären Medium über einen Spalt, der aus den Segmenten S1 und S5 geformt wird. Bei einer Membrandepolarisation kommt es zu einer Rotation und Aufrichtung des S4-Segmentes. Die oben erwähnten vier Aminosäurereste haben nun Kontakt zum extrazellulären Medium über einen Spalt, der durch die Segmente S2 und S3 geformt wird. Die Lageänderung des S4-Segmentes bewirkt über die Verbindung zum S5-Segment auch dessen Aufrichtung, wodurch die intrazellulären Enden der vier S5-Segmente eines Kanals auseinanderweichen. Dieser Umlagerung folgt ebenfalls das S6-Segment woraus eine Öffnung der Pore resultiert (Bezanilla 2000) (siehe Bild 2.13).

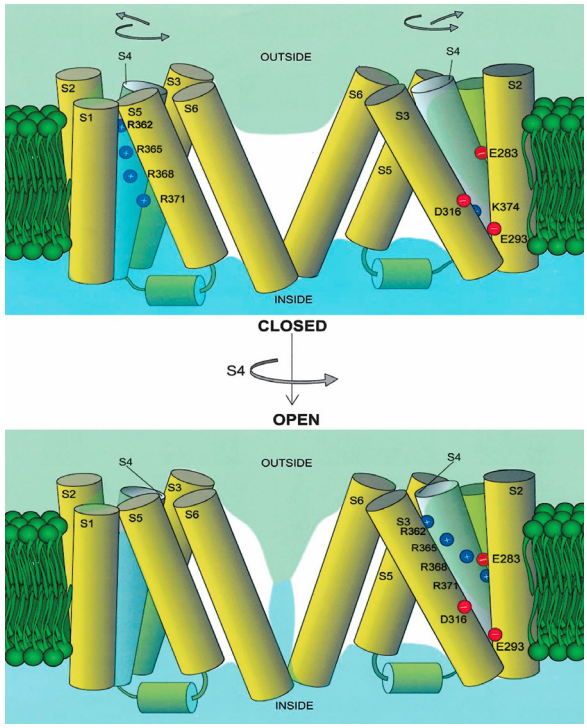


Bild 2.13: Modell der Konformationsänderung vom geöffneten zum geschlossenen Shaker-K^+-Kanal. Es sind zwei sich gegenüber liegende α-Untereinheiten abgebildet. Transmembrane Helices S1-S6; Oben: Hypothetische Struktur im geschlossenen Zustand, Unten: Angenommene Struktur im offenen Zustand; aus (Bezanilla 2000)

Kanalinaktivierung

Der Begriff Inaktivierung bezeichnet den Übergang von der geöffneten Konfiguration in einen geschlossenen, nicht leitenden Zustand während einer lang anhaltenden Membrandepolarisation. Eine schnelle Inaktivierung ist die in Millisekunden ablaufende N-Typ-Inaktivierung. Hierbei bindet ein Peptidball, der aus den ersten 20 Aminosäuren des N-Terminus gebildet wird (Hoshi, Zagotta et al. 1990) (siehe Bild 1.11), an die intrazellulär gelegene Schleife zwischen S4 und S5 und bewirkt so einen Verschluss der Pore (Isacoff, Jan et al. 1991; Holmgren, Jurman et al. 1996). Kanäle, die einen derartig schnellen Inaktivierungsprozess besitzen, werden als A-Typ-Kanäle bezeichnet. Die Bezeichnung C-Typ-Inaktivierung wurde für alle Inaktivierungsprozesse verwendet, die nicht durch eine Abtrennung des N-Terminus beeinflusst wurden. Es wurde angenommen, dass der zytoplasmatisch liegende C-

Terminus an dem Inaktivierungsvorgang beteiligt ist (Pongs 1992). Weitere Untersuchungen haben jedoch aufgezeigt, dass kooperative Konformationsänderungen im Bereich der äußeren Kanalöffnung wesentlich an der C-Typ-Inaktivierung beteiligt sind (Liu, Jurman et al. 1996). Ein weiterer Inaktivierungsmechanismus wurde aufgrund seiner U-förmigen Beziehung zwischen auslösender Spannung und Inaktivierung des Kanals als U-Typ-Inaktivierung beschrieben (Klemic, Kirsch et al. 2001).

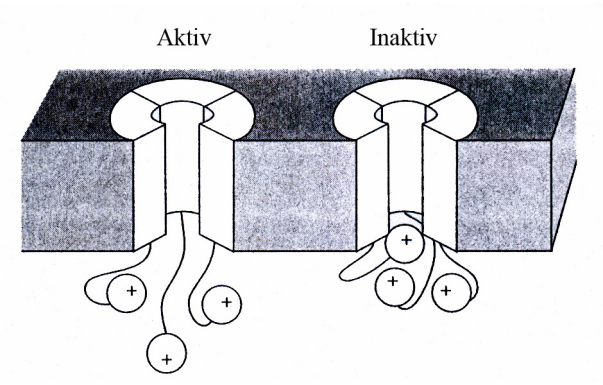


Bild 2.14: schematische Darstellung einer N-Typ-Inaktivierung, es sind drei α-Untereinheiten mit Peptidball am Amino-Terminus dargestellt. Im Falle der Inaktivierung bindet der Peptidball am Rezeptor und blockiert die Pore, aus (Hille 2001)

2.4.3 Der Kv1.3-Kanal und seine Bedeutung im retinalen Pigmentepithel

Die Kv1.3-Kanäle kommen in verschiedenen Zellen und Geweben des Körpers vor. Dazu gehören T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, neuronale Gewebe, Retina, Milz, Niere, Fibroblasten, Makrophagen und Blutplättchen (Koo, Blake et al. 1997; Pinto and Klumpp 1998; Teisseyre and Mozrzymas 2006,Mackenzie, 2003 #142; Höltje 2007). Kv1.3 α-Untereinheiten sind Bestandteil von homo- und heterotetrameren Kaliumkanälen. Eine einzelne Kv1.3 α-Untereinheit besitzt eine Masse von ca. 64 kDa. Die Gesamtmasse eines homomeren Kanals beläuft sich auf 270 kDa. Die Gesamtdimension des Kanals ist mit 65 x 65 Å annähernd quadratisch (Spencer, Sokolov et al. 1997). Die Kanalpore hat einen extrazellulären Vorhof mit einem Durchmesser von 30 Å und einer Tiefe von 4-6 Å. Der eigentliche Poreneingang verengt sich auf 9 Å. Im Bereich des sich anschließenden Selektivitätsfilters ist der Durchmesser noch einmal auf 5 Å reduziert (Aiyar, Withka et al. 1995; Aiyar, Rizzi et al. 1996).

Der Austausch von K^+-Ionen über die Zellmembran (apical und basal) von RPE-Zellen ist im Hinblick auf die gesamte Physiologie des RPE essentiell, insbesondere ist die Erhaltung der Homöostase des subretinalen Raums durch das RPE von lebenswichtiger Bedeutung für die Photorezeptoren. Die Regulation der K^+-Konzentration in diesem Spaltraum hat einen wesentlichen Einfluß auf den intrazellulären pH-Wert, auf den Wassergehalt oder auf die Aktivität anderer Ionen in der RPE-Zelle und ist abhängig von der K^+-Leitfähigkeit der apicalen Zellmembran. Unter Verwendung der Patch-Clamp-Methode, haben verschiendene Autoren spannungsabhängige K^+-Ströme über RPE-Membranen dargestellt (Strauss, Richard et al. 1993; Strauss, Weiser et al. 1994; Hughes, Takahira et al. 1995; Hughes and Takahira 1996; Takahira and Hughes 1997). Der K^+-Ionenfluß wurde sowohl über die apicale als auch über die basolaterale Zellmembran nachgewiesen (Miller and

Steinberg 1977; Joseph and Miller 1991; Quinn and Miller 1992,Strauss 2005; Hernandez, Hu et al. 1995). Der K^+-Transport über die apicale Membran verläuft auf drei unterschiedlichen Wegen:

1. über Kir7.1 (einwärts rektifizierende) Kaliumkanäle
2. einen Na^+-K^+-$2Cl^-$- Cotransport
3. ein aktiver Transport über die Na^+/K^+-ATPase

Die K^+-Leitfähigkeit an der apicalen Zellmemran wird mit hoher Wahrscheinlichkeit hauptsächlich durch einwärts rektifizierende K^+-Kanäle gewährleistet (Hughes and Takahira 1998). An der basolateralen Membran werden Ba^{2+}-empfindliche K^+-Ströme und die Aufnahme von KCl beschrieben (Marmor and Wolfensberger 1998). Die Kanäle, die die K^+-Leitfähigkeit der basolateralen Membran begründen, konnten bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Zwei dafür prädestinierte Kanäle sind ein Ca^{2+}-abhängiger K^+-Kanal (Tao and Kelly 1996; Ryan, Baldridge et al. 1999) und ein M-Typ-K^+-Kanal (Takahira and Hughes 1997), die beide eine hohe K^+-Leitfähigkeit über einen großen Membranpotentialbereich besitzen.

Bisher wurden vier spannungsabhängige K^+-Ströme funktionell an RPE-Zellen aufgezeigt:

1. ein verspätet rektifizierender (delayed rectifier) K^+-Strom (Hughes and Steinberg 1990; Strauss, Richard et al. 1993; Strauss, Weiser et al. 1994; Strauss, Rosenthal et al. 2002)
2. ein auswärts rektifizierender K^+-Strom, der bei anhaltender Membrandepolarisierung nicht inaktiviert (sustained outward rectifier) (Hughes, Takahira et al. 1995; Takahira and Hughes 1997)
3. ein einwärts rektifizierender (inward rectifier) K^+-Strom (Hughes and Steinberg 1990; Wen, Lui et al. 1993; Segawa and Hughes 1994; Hughes and Takahira 1996)
4. ein auswärts rektifizierender calciumabhängiger K^+-Strom (Tao and Kelly 1996; Ryan, Baldridge et al. 1999).

Pinto et al. konnten an Mäuse-Retina mit Hilfe der PCR-Methode, immunhistochemischen Färbungen und der in situ Hybridisierung die α-Untereinheiten Kv1.2, Kv1.3, Kv1.4, Kv2.1 und Kv4.2 darstellen. Kv1.3-wurden an den apicalen Ausläufern der des RPE vermutet (Pinto and Klumpp 1998).

Strauss et al. haben an Ratten-RPE-Zellen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik auswärts rektifizierende (delayed rectifier) Kaliumströme nachgewiesen, die über, aus Kv1.3 Untereinheiten zusammengesetzte, Kaliumkanäle laufen. In begleitenden Western-blot-Analysen von Membranproteinen konnte dies bestätigt werden. Es ist unwahrscheinlich, dass der delayed rectifier K^+-Kanal vom Typ Kv1.3 die K^+-Leitfähigkeit der RPE-Zelle im Ruhezustand gewährleistet, da dieser im Bereich des Membranruhepotentials nicht aktiviert ist. Dieser Kanaltyp scheint eher an Regulationsprozessen beteiligt, wie z.B. der Kontrolle des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels, zu sein. Hierbei verstärken zytosolische Tyrosinkinasen vom src-Typ die

auswärts rektifizierenden (delayed rectifier) Kaliumströme, was wiederum stabilisierend auf das Membranruhepotential wirkt. Regulative Funktion könnte dabei die Proteinkinase C besitzen, denn ihre Aktivierung bewirkte einen hemmenden Einfluss der Thyrosinkinase auf die gemessenen Kaliumströme (Strauss, Rosenthal et al. 2002). Spannungsabhängige L-Typ Calciumkanäle werden ebenfalls durch die Tyrosinkinase vom src-Typ aktiviert, was zu einem Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle führt (Strauss, Mergler et al. 1997; Strauss, Buss et al. 2000). Deshalb wird eine antagonistische Funktion von K^+-Kanälen zu spannungsabhängigen Ca^{2+}-Kanälen bei der Kontrolle der intrazellulären Ca^{2+}-Homöostase im RPE angenommen (Strauss, Rosenthal et al. 2002). Dieser Mechanismus ist bereits in anderen Geweben nachgewiesen worden (Nelson, Patlak et al. 1990; Sweeney and Yuan 2000).

2.5 RPE-Kultivierung

Grundlage für die zellbasierte Therapie degenerativer Netzhauterkrankungen ist ein möglichst umfassendes Verständnis für die RPE-Physiologie. Die Kultivierung von RPE-Zellen unter Erhalt ihrer natürlichen Eigenschaften ist Voraussetzung für die Erforschung physiologischer und pathophysiologischer Zusammenhänge. Darüber hinaus besteht ein großes Interesse an RPE-Zellkulturen als Quelle für Gewebstransplantate. Bereits 1972 konnten Albert et al. RPE-Zellen aus humanen Augen isolieren indem sie die Choroidea mit anhaftendem RPE explantierten und daraus Zellkulturen anlegten (Albert, Tso et al. 1972). Mannagh et al. isolierten RPE-Zellen erstmalig aus humanen Augen enzymatisch mit einer Pronaselösung und konnten diese als Primärkultur bis zu 6 Monate kultivieren (Mannagh, Arya et al. 1973). Weitere zahlreiche Autoren untersuchten Techniken zur Zellisolierung und Kulturmethoden hinsichtlich des Wachstumsverhaltens und Morphologie der RPE-Zellen (Edwards 1982; Boulton, Marshall et al. 1983; Hewitt and Newsome 1987; Baumgartner, Huber-Spitzy et al. 1989; Pfeffer 1991; Baumgartner, Asenbauer et al.

1992; Sobottka Ventura, Böhnke et al. 1996). Darüber hinaus verglichen Edwards et al. und Boulton et al. die Morphologie zwischen kultivierten RPE-Zellen aus normalen Spenderaugen und Spenderaugen mit degenerativen Netzhauterkrankungen. Pfeffer entwickelte 1991 ein spezielles Kulturmedium zur RPE-Kultivierung. Durch zwei Varianten diese Mediums konnte entweder eine Proliferation oder eine Differenzierung gefördert werden (Pfeffer 1991). Bei den bisherigen RPE-Kultur-Methoden kann es zu Veränderungen wesentlicher morphologischer und funktioneller Eigenschaften kommen (Song and Lui 1990; Pfeffer 1991; Strauss, Weiser et al. 1994; Burke, Skumatz et al. 1996; Zhao, Rizzolo et al. 1997; Gelfman, Kelleher et al. 1998; Valtink, Engelmann et al. 1999; West, Yan et al. 2001; Alge, Suppmann et al. 2003; Engelmann and Valtink 2004). Das verwendete Kulturmedium hat hierbei einen entscheidenden Einfluss. Traditionell kommen Zellkulturbasalmedien zur Anwendung, die nicht speziell auf die Kulturbedürfnisse von RPE-Zellen abgestimmt sind. Dabei handelt es sich um physiologische Salzlösungen mit Supplementen wie Zucker, Aminosäuren, zusätzliche Ionenpuffer, Vitaminen, pH Indikatoren, Antioxidanzien, Lipiden und anderen Energieträgern (Dulbecco and Freeman 1959; Ham and McKeehan 1979). Bei vergleichenden Untersuchungen erwies sich die Medienmischung F99 bestehend aus den beiden Basalmedien Ham´s F12 und Medium 199 (1:1-Verhältnis) hinsichtlich der Proliferation als am wirkungsvollsten. Von diesem Basalmedium ausgehend wurde durch Zusatz verschiedener Supplemente das Vollmedium $F99_{RPE}$ entwickelt, das speziell zur Proliferation von adulten RPE-Zellen konzipiert wurde. Es konnte darüber hinaus anhand der Ausbildung typischer Ionenkanäle gezeigt werden, dass ein gewisser Differenzierungsgrad in Kultur erhalten werden konnte (Valtink, Engelmann et al. 1999; Engelmann and Valtink 2004). Zur Steigerung der Proliferation wird traditionell Serum als Mediensupplement verwendet. Die Zusammensetzung von Serum ist komplex und weitestgehend unbekannt. Darüber hinaus kommt es häufig in unphysiologisch hohen Konzentrationen zum Einsatz. Die Verwendung von Serum als

Mediensupplement bedeutet demzufolge eine Art Kontrollverlust über die Kulturbedingungen, da diese nicht mehr definiert sind und die Auswirkungen auf die Kultur nicht vollständig bekannt sind. Beispielweise stört Serum bei der Stimulation und Detektion RPE-sezernierter Stoffe (Peng, Rahner et al. 2003) oder Serum verhindert die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten (tight-junctions) zwischen RPE-Zellen (Chang, Ye et al. 1997). Weiterhin stellt der Einsatz von Serum bei der Herstellung von RPE-Kulturen, die zur Transplantationstherapie verwendet werden sollen, ein Übertragungsrisiko von Infektionskrankheiten (z.B. bovine spongiose Enzephalopathie) dar. Demzufolge ist die Serumfreiheit ein Ziel bei der Entwicklung eines Vollmediums zur Kultivierung von RPE-Zellen in vitro. Erfolgreich war beispielsweise bereits die Verwendung des kommerziell erhältlichen und in seiner Zusammensetzung definierten serumfreien Mediums hSFM. Unter Verwendung dieses Mediums konnten typische morphologische Charakteristika wie Pigmentierung, Mikrovilli und Proteinexpression von ZO1 in der Kultur erhalten werden, die beim Einsatz serumhaltiger Medien obligatorisch verloren gehen (Doubilei, Bednarz et al. 2002). Für adhärente Zellen wie RPE-Zellen ist neben den löslichen Mediatoren, die über das Medium zugeführt werden, das Substrat, auf dem die Zellen anheften, ebenso bedeutend (Newsome, Pfeffer et al. 1988; Tezel and Del Priore 1997). In ihrer natürlichen Umgebung und in vitro ist dieses Substrat die Extrazellularmatrix (ECM), bestehend aus Laminin, Fibronektin, Kollagen I+II und Vitronektin. Über Integrin erfolgt die Bindung der RPE-Zellen an die ECM (Ho and Del Priore 1997). Es ist vielfach gezeigt worden, dass die ECM, beziehungsweise das Substrat, einen weit reichenden Einfluss auf Proliferation, Adhärenz, Differenzierung und chemotaktisches Verhalten der RPE-Zellen hat (Campochiaro, Jerdon et al. 1986; Docherty, Forrester et al. 1987; Strauss and Wienrich 1994; Tezel, Del Priore et al. 1997). Die ECM wird auch in vitro von den RPE-Zellen produziert. Um eine schnelle Anheftung zu erreichen und der natürlichen Umgebung möglichst nahe zu kommen, kann eine der Aussaat vorausgehende

Beschichtung mit ECM durchgeführt werden. Die Beschichtung mit ECM führt zu einer gesteigerten Proliferation, die jedoch mit Dedifferenzierungsvorgängen verbunden ist (Krüger, Drexler et al. 1997). Die Qualität der ECM beeinflusst hierbei derartige Dedifferenzierungen. Die Struktur und Zusammensetzung der ECM wird im Wesentlichen durch die Zellen determiniert, die sie produzieren. Dadurch kann sie variable Einflüsse auf die Proliferation und Morphologie der darauf kultivierten Zellen haben (Newsome, Pfeffer et al. 1988; Tezel and Del Priore 1997). Dementsprechend ist die ECM ähnlich undefiniert wie Serumsupplement, und hat demzufolge ebenfalls unvorhersagbare Einflüsse auf die Zellkultur. Die Beschichtung mit einzelnen Bestandteilen der ECM (z.B. Fibronektin) oder günstigen Ersatzstoffen wie Gelatine umgeht diesen Nachteil, während Vorteile wie die Erleichterung der Anheftung nach der Aussaat trotzdem gegeben sind.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

3.1.1 Synthetische Medien und Mediensupplemente

Medium199 und Ham`s F12 (Pulver)	Gibco BRL (Paisley, UK)
Human Endothelium-Serumfree Medium	Invitrogen (Carlsbad, USA)
bFGF	Invitrogen (Carlsbad, USA)
EGF	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Fetales Kälberserum (fetal calf serum, fcs)	Seromed (Berlin, Deutschland)
D-Glukose (flüssig)	Gibco BRL (Paisley, UK)
Insulin (Pulver)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Natriumpyruvatlösung (100mM)	Biochrom KG (Berlin, Deutschland)
Gentamycin (flüssig)	Gibco BRL (Paisley, UK)
Amphotericin B (Pulver)	Biochrom KG (Berlin, Deutschland)

Rezeptur Medium $F99_{RPE}$:

1. Medium 199 und Ham`F12 zu gleichen Teilen
2. 10 % fetales Kälberserum
3. Insulin 1 µg/ml
4. Natriumpyruvat 1mM
5. Amphotericin B 2,5 µg/ml
6. Genatmycin 50 µg/ml

3.1.2 Enzyme und Pufferlösungen

Collagenase Typ IA und Typ IV	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Trypsin / EDTA (0,02% / 0,05% Lösung)	Gibco BRL (Paisley, UK)
PBS (Dulbecco`s phosphatgepufferte NaCl-Lösung ohne Ca^{2+}, Mg^{+})	Seromed (Berlin, Deutschland)
Tris-HCl (Trizma®)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

3.1.3 Beschichtungsproteine und allgemeine Chemikalien

Fibronektin	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
Gelatine	Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
Salzsäure 0,1 M; 1M	Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge 0,1M; 1M	Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (70% / 99%)	Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

3.1.4 Antikörper und Chemikalien zur immunhistochemischen Färbung

Antikörper Anti-Kv1.3	Alomone Labs (Jerusalem, Israel)
HRP-konjugierter Link-Antikörper	Dako (Carpinteria, USA)
AP-konjugierter Link-Antikörper	Dako (Carpinteria, USA)
Rhodamin. Red™ Link-Antikörper	Molecular Probes (Eugene, USA)
FITC Link-Antikörper	Dako (Carpinteria, USA)
Proteinase K	Dako (Carpinteria, USA)

Peroxidase Blockierreagenz	Dako (Carpinteria, USA)
Dako-Pen	Dako (Carpinteria, USA)
AEC Substrat System	Dako (Carpinteria, USA)
LSAB + System AP (Alkalische Phosphatase)	Dako (Carpinteria, USA)
4% Formaldehyd (Formalin)	Merck (Whitehouse Station, USA)
Ethanol/Glycin (70% in 50 mmol Glycin-Puffer)	Apotheke des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf / Merck AG (Darmstadt, Deutschland)

3.2 Geräte und Materialien

Sterile Werkbänke Typ Lamin. Air HB 2472, HB 2448 und HeraSafe	Heraeus (Deutschland)
CO_2-Auto-Zero-Brutschrank	Heraeus (Deutschland)
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Pipetten (variables Vol.) Research; 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Augenschere (gebogen)	Geuder (Heidelberg, Deutschland)
Kolibripinzette	Geuder (Heidelberg, Deutschland)
Laborzentrifuge Omnifuge 2.0 RS	Heraeus Sepatech (Osterode, Deutschland)
pH-Meter Typ CG820	Schott (Mainz, Deutschland)
Analysenwaage Typ P162N	Mettler Toledo (Giessen, Deutschland)
Magnetrührer Ikamag	IKA (Staufen, Deutschland)
Milli-Q-UF Plus	Millipore AG (Schwalbach, Deutschland)

Schlauchpumpe	Millipore AG (Schwalbach, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen (15ml)	Nalge Nunc Intern. (Naperville, USA)
Zentrifugenröhrchen (50ml)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Serologische Pipetten (1, 2, 5, 10, 25, 50 ml)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, USA)
Zellkulturschalen (6-, 12-, 24-Loch)	Corning Inc. (Corning, USA)
Lab-Tek Chamberslide permanox (8-Loch)	Nalge Nunc Intern. (Naperville, USA)
Transwell® Zellkulturschalen (Polyester-Membran, Porengröße 0,4 µm, 6-Loch)	Corning Costar Corporation (Cambridge, USA)
Einmalspritzen (5, 10, 25 ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Bottle Top Filter (500 ml, 0,22 µm)	Corning Inc. (Corning, USA)
Millex GV Filter (0,22 µm)	Millipore AG (Schwalbach, Deutschland)
Handschuhe SafeSkin (Latex, puderfrei)	Kimberly-Clark (Roswell, USA)
Sterillium Händedesinfektion	Bode (Hamburg, Deutschland)
Invert-Mikroskop IX51(mit Phasenkontrast und Fluoreszenzadapter)	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Digitalkamera Color View II (3,3 Megapixel CCD-Kamera)	Soft Imaging Systems (Münster, Deutschland)
Objektträger Superfrost	Menzel Gläser (Braunschweig, Deuntschland)
Deckgläschen 24x32 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen, Deutschland)

Aquatex Eindeckelmedium	Merck (Whitehouse Station, USA)

3.3 Gewinnung und Kultivierung humaner RPE-Zellen

3.3.1 Isolierung

Die RPE-Zellen wurden aus den Augen Verstorbener isoliert, die nach Einwilligung zur Hornhautspende für die Hornhautbank der Universitäts-Augenklinik Hamburg entnommen wurden. Nach Entfernung der Korneoskleralscheibe für die Horhauttransplantation, wurde die dadurch entstandene kreisförmige Öffnung des Bulbus um 3-4 mm erweitert. Um den Glaskörper entfernen zu können, wurden Iris, Ziliarkörper und Linse abpräpariert. Durch eine Halbierung bis zum N. opticus, konnte der Bulbus aufgeklappt werden. Dies wiederum ermöglichte eine schonende Ablösung der Choroidea mit anheftendem RPE, nachdem vorweg die neurale Retina entfernt wurde.

Nach einer Waschung in 2 ml PBS für 5 Minuten, erfolgte eine Inkubation der Choroidea in 2 ml Kollagenaselösung (IA+IV, 1:1-Gemisch in Basalmedium F99, Gesamtkollagenase 1 mg/ml) für 1 Std. bei 37 °C und 5% CO_2. Durch die Zugabe von 3 ml F99 + 10% FCS wurden die abgelösten Zellen suspendiert. Mit vorsichtigem Schwenken der Aderhaut konnten weitere noch lose anhaftende RPE-Zellen abgelöst werden. Die suspendierten Zellen wurden mit 100 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Eine Resuspensierung des Zellpellets erfolgte in 8 ml Wachstumsmedium $F99_{RPE}$.

3.3.2 In vitro-Kultivierung

Die Zellen wurden dann primär in die acht zentralen Löcher einer 24-Loch-Schale ausgesät. Entweder ging eine Beschichtung mit Gelatine oder Fibronektin voraus oder die Löcher blieben unbeschichtet.

Eine 24-stündige Ruhephase im CO_2-Brutschrank bei 37 °C erlaubte eine Anheftung der unbeschädigten Zellen. Nach dieser Zeit wurde das Medium mit den nicht angehefteten Zellen und Detritus abgesaugt und frisches Medium (1 ml / Loch) zugefügt. Mindestens drei Mal pro Woche erfolgte ein Austausch des Mediums. Sobald die Zellen sich zu einer konfluenten Schicht vermehrt hatten, wurden sie weiter subkultiviert.

Hierzu erfolgte eine Ablösung der Zellen von der Kulturschale durch Trypsinierung mit einer Trypsin / EDTA-Lösung (0,05% / 0,02%). Nach der Beschickung der einzelnen Löcher der Kulturschalen mit der Lösung wurde diese sofort bis auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm wieder abgesaugt. Die Einwirkzeit betrug 3 Minuten, hiernach wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{+}) suspendiert. Es folgte die Zugabe des FCS-haltigen Wachstumsmediums $F99_{RPE}$, wobei gleichzeitig die Enzymreaktion gestoppt wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (100 x g, RT, 5 min.), in Wachstumsmedium resuspendiert und danach ausgesät. Die Kulturgefäße wurden vor der Passagierung mit dem jeweiligen Substrat beschichtet oder ohne Beschichtung belassen.

Die Aussaat erfolgte nach folgendem Schema:

Die Zellen von zwei Löchern der Primärkultur wurden passagiert. Die restlichen Löcher wurden für die Färbeversuche verwendet (s.u.). Eine weitere Kultivierung fand dann in jeweils 2 Löchern einer 24-Loch-Schale und in $1^1/_2$ Chamberslides (insges. 12 Löcher) statt. Die Zellen der 24-Loch-Schalen wurden jeweils bis zur vierten Passage

subkultiviert. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht auf den Chamberslides erfolgte die immunhistochemische Färbung.

Um die Distribution der Kv 1.3-Untereinheiten in kultiviertem RPE zu untersuchen, wurden die Zellen auf Transwell®-Membranen gezüchtet. Dieses Vorgehen erlaubte die Anfertigung von Kryoschnitten und damit die Möglichkeit, die kultivierten Zellen im Querschnitt zu betrachten (s.u.). Im Gegensatz zur oben beschriebenen Methode, wurden die Zellen in der Primärkultur mit serumfreien Medium (hSFM) ausgesät und gefüttert. Zusätzlich erfolgte eine Supplementierung mit bFGF (20 ng/ml), EGF (10 ng/ml) und Fibronektin (50 µg/ml). Nach der ersten Passagierung wurden die Zellen dann auf der Transwell®-Membran ausgesät und mit $F99_{RPE}$-Medium gefüttert. Nach Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden die bewachsenen Membranen kryokonserviert und anschließend histologische Schnitte (4 µm) angefertigt.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 Etablierung einer Färbemethode zum Nachweis von Kv 1.3 α-Untereinheiten an kryokonservierten Mäusehirnschnitten

Zum Nachweis von Kv 1.3-Untereinheiten wurde die LSAB-Methode angewendet. Der primäre Antikörper bindet an den intracellulär gelegenen C-Terminus der Kv 1.3 Untereinheit im Bereich der Aminosäurenreste 471-523. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte mit Antibody Diluent (Dako). Zur Negativkontrolle wurden die Primärantikörper vor ihrer Anwendung mit den korrespondierenden Blockpeptiden inkubiert. Die kryokonservierten Mäusehirnschnitte wurden von der Arbeitsgruppe O. Strauss/ U. Bartsch der Universitäts-Augenklinik Hamburg zu Verfügung gestellt.

Die erste Färbereihe erfolgte mit folgendem Protokoll:

1. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)
2. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100 für 30 min. bei 37 °C und bei RT
3. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
4. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (LSAB®-Kit) für 10 min. bei RT
5. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
6. Inkubation mit Streptavidin-AP-Konjugat (LSAB®-Kit) für 10 min. bei RT
7. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
8. Inkubation mit Substrat-Chromogenlösung (LSAB®-Kit) für 10 min. bei RT
9. Spülung mit Aqua dest.
10. Um eine mögliche Hintergrundfärbung durch endogene alkalische Phosphatase auszuschließen, kam ein FITC-markierter Sekundärantikörper zur Anwendung:
11. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)
12. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100 für 30 min. bei 37 °C und bei RT

13. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

14. Inkubation mit FITC-markierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 und 1:50 für 30 min. bei RT

15. Spülung mit Aqua dest.

Im nächsten Schritt wurde ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper getestet.

16. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)

17. Inkubation mit Peroxidaseblocker für 5 min.

18. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)

19. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100 / 1:10, 30 min. bei 37 °C und bei RT

20. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

21. Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 für 15 min. bei RT

22. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

23. Inkubation mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Dako) für 15 min. bei RT

24. Spülung mit Aqua dest.

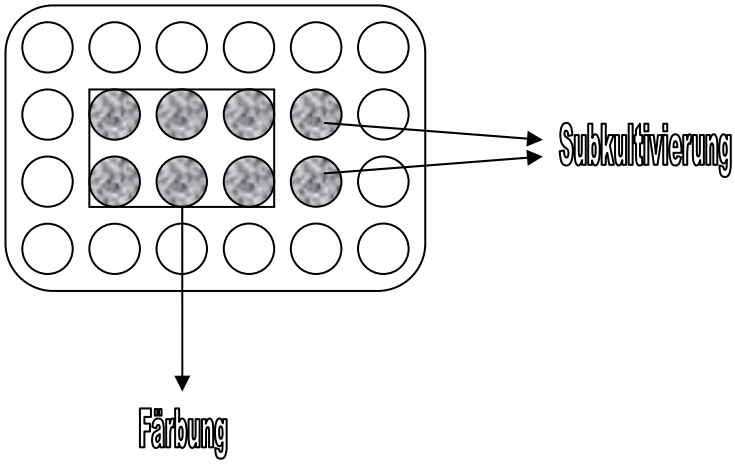
3.4.2 Anwendung des etablierten Protokolls zur Färbung von humanen Paraffinschnitten des hinteren Augenabschnitts

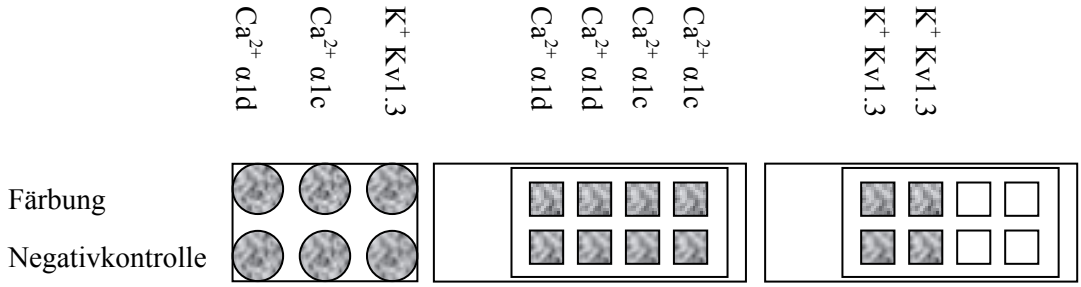
Die Verwendung von Paraffinschnitten erforderte eine Modifizierung des etablierten Protokolls. Nach der Entparaffinierungsroutine, erfolgte eine Behandlung mit Proteinase K®, um eine Demaskierung des Epitops nach der Paraformaldehydfixierung zu erreichen. Die weiteren Schritte wurden aus der etablierten Methode übernommen. Die verwendeten Paraffinschnitte wurden durch die Arbeitsgruppe U. Schaudig histopathologisches Labor der Universitäts-Augenklinik Hamburg zur Verfügung gestellt.

1. 25 min. Entparaffinieren in Xylol
2. Hydrieren in absteigender Ethanolreihe (100%, 96%, 80%) je 3 min.
3. Spülung mit Aqua dest.
4. 3 min. in Tris-Puffer spülen
5. 10 min. Proteinase K®
6. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)
7. Inkubation mit Peroxidaseblocker für 5 min.
8. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)
9. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100 für 30 min. bei 37 °C und bei RT
10. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
11. Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 für 15 min. bei RT
12. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
13. Inkubation mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Dako) für 15 min. bei RT
14. Spülung mit Aqua dest.

3.4.3 Modifizierung der Färbemethode zum immunhistochemischen Nachweis von Kv 1.3 Untereinheiten in kultivierten RPE-Zellen

In modifizierter Form wurde das Färbeprotokoll verwendet, um Kv 1.3-Untereinheiten in kultivierten RPE-Zellen zu detektieren. Die Färbung erfolgte direkt in den Kulturgefäßen. Die Primärkulturen wurden in 24-Lochschalen (6 Löcher) und die Subkulturen auf Chamberslides ($1^1/_2$ CS also 12 Löcher) gefärbt.





1. Spülung mit Trispuffer (3 min.)
2. Fixierung mit 3,5 %igem Paraformaldehyd
3. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
4. 10 min. Proteinase K®
5. Spülung mit Trispuffer (3 min.)
6. Inkubation mit Peroxidaseblocker für 5 min.

7. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)

8. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100 für 30 min. bei 37 °C und bei RT

9. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

10. Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 für 15 min. bei RT

11. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

12. Inkubation mit AEC für 15 min. bei RT

13. Spülung mit Aqua dest.

Um die Wahrscheinlichkeit einer Epitopmaskierung zu verringern, kam als Fixans eine Ethanol / Glycin-Mischung (70% / 30%) zur Anwendung.

1. Spülung mit Trispuffer (3 Min)

2. Fixierung mit Ethanol/Glycin 20 Min bei -20 °C

3. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 Min)

4. Inkubation mit Peroxidaseblocker für 5 min.

5. Spülung mit Tris-Puffer (3 min.)

6. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:100, 1:50, 1:25 und 1:10 für 30 min. bei 37 °C und bei RT

7. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

8. Inkubation mit HRP-konjugierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 für 15 min. bei RT

9. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)

10. Inkubation mit AEC für 15 min. bei RT

11. Spülung mit Aqua dest.

3.4.4 Nachweis von Kv 1.3 Untereinheiten in Kryoschnitten von kultivierten RPE-Zell-Monolayern

Das Färbeprotokoll wurde zur Färbung der auf semipermeablen Kollagenmembranen kultivierten RPE-Zellen modifiziert. Ein mit Rhodamin. Red™ markierter Sekundärantikörper kam hierbei zur Anwendung.

1. Spülung mit Trispuffer (3 min.)
2. Fixierung mit Ethanol/Glycin 20 min. bei -20 °C
3. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
4. Inkubation mit Primärantikörper, Verdünnung 1:10 für 30 min. bei 37 °C und bei RT
5. Spülung mit Tris-Puffer (3 x 3 min.)
6. Inkubation mit Rhodamin. Red™ konjugierten Sekundärantikörpern, Verdünnung 1:100 für 30 min.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer Färbemethode zur Darstellung von Kv1.3 Untereinheiten in kryokonservierten Mäusehirnschnitten

Zum Nachweis und zur Lokalisierung von Kv1.3-Kaliumkanälen in RPE Zellen wurde die immunhistochemische Färbemethode angewandt. Diese Technik ermöglicht den Nachweis sowohl der Expression als auch der Lokalisation der Zielstruktur. Der zur Markierung verwendete Primärantikörper ist ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper. Das zu erkennende Epitop liegt am intrazellulären C-Terminus der Kv1.3-Untereinheit (Aminosäurereste 471-523). Die intrazelluläre Lage der antigenen Determinante innerhalb der Zellmembran erforderte eine unterschiedliche Vorbehandlung der verschiedenen Gewebe, an denen der Nachweis durchgeführt werden sollte.

Die zuerst angewendete Färbung mit der LSAB-Methode (Labelled Streptavidin Biotin, LSAB-Kit, Dako) ergab eine starke, unspezifische Hintergrundfärbung, die eine Identifizierung der Zielstrukturen unmöglich machte.

Bei der anschließenden Verwendung eines FITC-markierten Sekundärantikörpers zur Visualisierung konnten die Zielstrukturen nicht detektiert werden. Ein Fluoreszenzsignal war nicht zu erkennen, es lag keine unspezifische Hintergrundfärbung vor.

Die Modifizierung des Protokolls durch die Anwendung eines HRP-konjugierten Antikörpers (1:10, Inkubation: 30 Min. bei 37°C) in Kombination mit AEC als Chromogen erbrachte ein positives spezifisches Färbeergebnis bei gleichzeitig stark reduzierter unspezifischer Hintergrundfärbung, so dass die Zielstruktur sicher erkannt

werden konnte. Angefärbte Zellen sind über den gesamten Gewebeschnitt gleichmäßig verteilt mit einer streifenförmigen Ansammlung im Bereich der Hirnrinde. Die Zellen zeigen im Färbebild eine rötlich-braune Grundfärbung mit einer punktuell über die Zelle verteilten Färbung. Die Negativkontrolle weist keine Anfärbung auf, so dass die Färbung als spezifisch positiv angesehen werden kann.

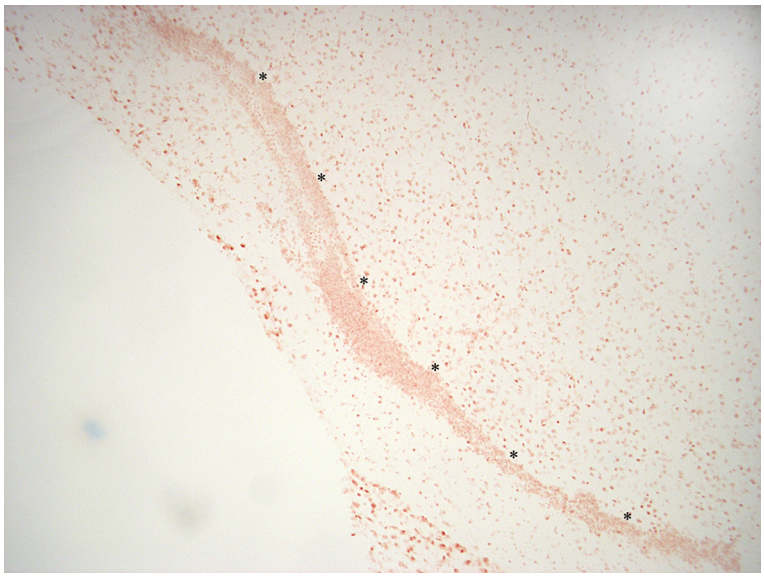


Bild 4.1: Kv1.3 Untereinheiten sind im gesamten dargestellten Hirngewebe gleichmäßig verteilt mit deutlicher Ansammlung im Cortexbereich (Stern). Vergr.: 10x

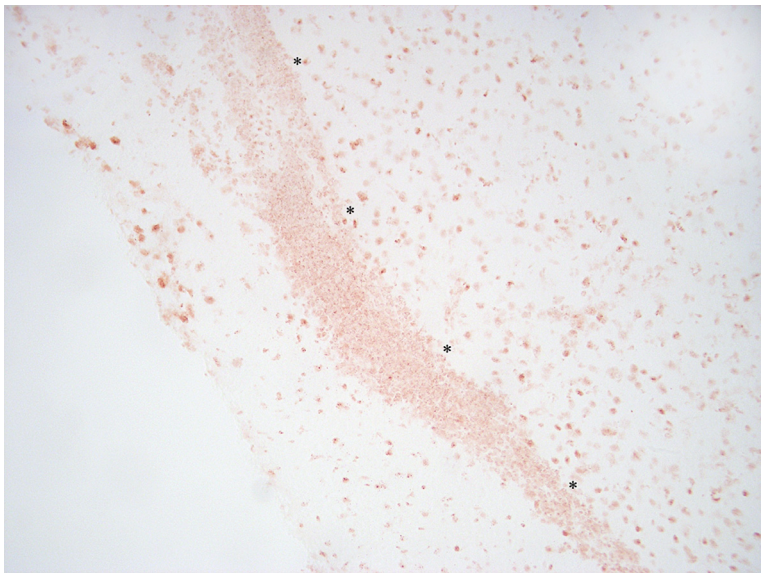


Bild 4.2: Es liegt eine streifenförmige Ansammlung von Zellen mit Kv1.3 Untereinheiten im Bereich der Hirnrinde vor. Vergr.: 100x

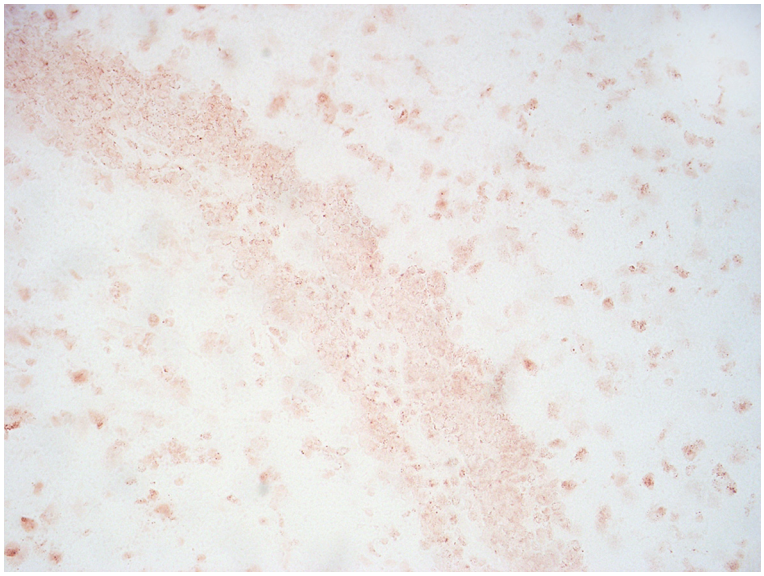


Bild 4.3: Im Ausschnitt ist die kortikale Färbung der Kv1.3-Kanäle dargestellt. Vergr.: 400x

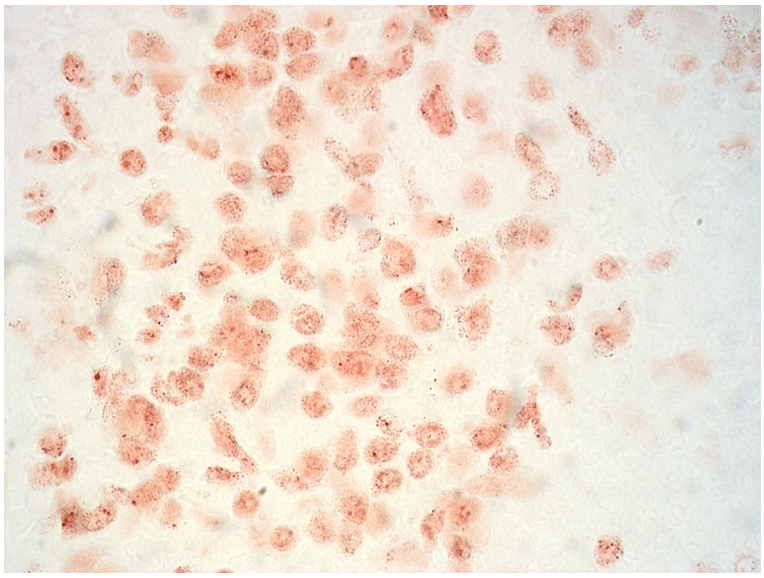


Bild 4.4: Es sind neben einer rötlichen Grundfärbung des gesamten Zellkörpers deutliche dunkelrote punktuelle Anfärbungen streuselartig über die Zelle verteilt. Vergr.: 1000x

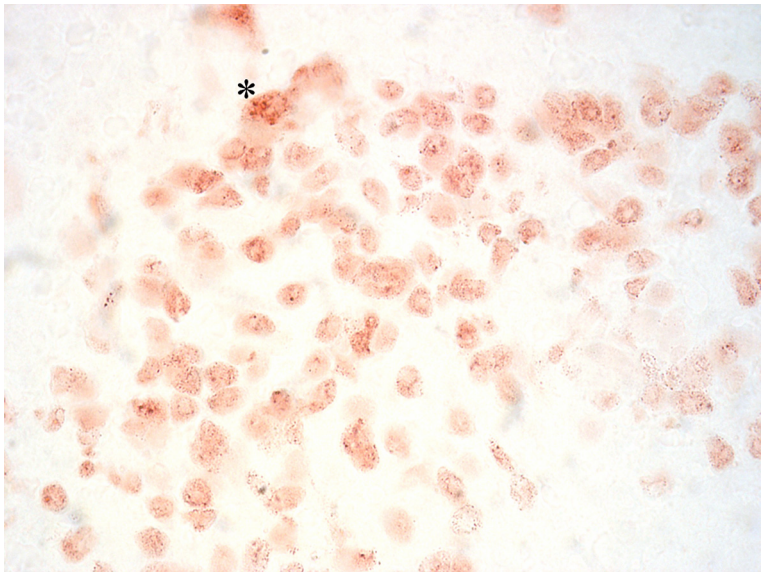


Bild 4.5: Im Bereich des markierten Zellkörpers sind Akkumulationen von Kv1.3-Kanälen erkennbar. Vergr.: 1000x

Bild 4.6: Die Negativkontrolle stellt sich ohne Anfärbung dar. Vergr.: 200x

4.2 Anwendung des etablierten Protokolls zur Färbung von Paraffinschnitten humaner Hinteraugenabschnitte

Mit dem am Mäusegewebe etablierten Färbeprotokoll gelang an Paraffinschnitten von humanen Hinteraugenabschnitten der in Situ-Nachweis von Kv1.3-Kanälen in retinalen Pigmentzellen. Der gesamte in den Bildern sichtbare Abschnitt des RPEs weist eine deutliche Färbung im Bereich der Basalmembran auf. Im vergrößerten Bildausschnitt ist erkennbar, dass die Färbelinie entlang der basolateralen Zellgrenzen verläuft. Diese ist aufgrund Ihrer Intensität und Morphologie als spezifisch von der darüber hinaus vorliegenden, unspezifischen Hintergrundfärbung abgrenzbar.

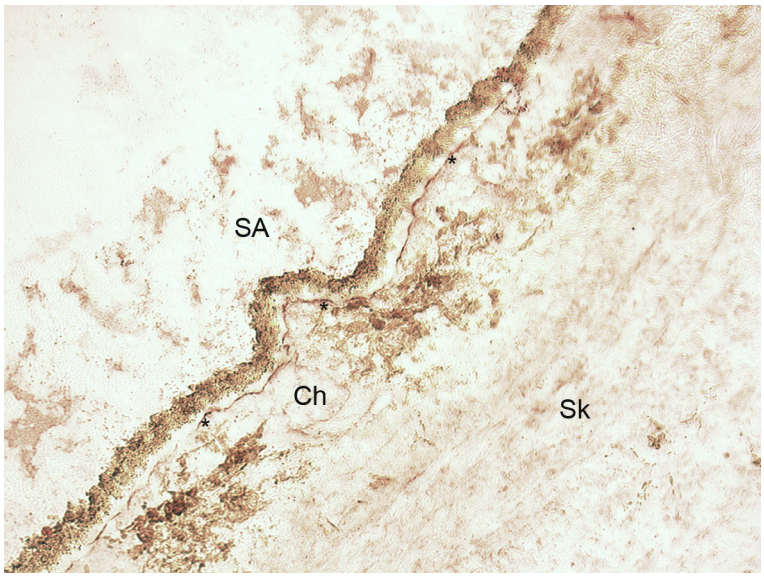


Bild 4.7: Kv1.3 Untereinheiten gefärbt im Bereich der Basalmembran des gesamten RPE (Stern). Vergr.: 20x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, Sk: Sklera

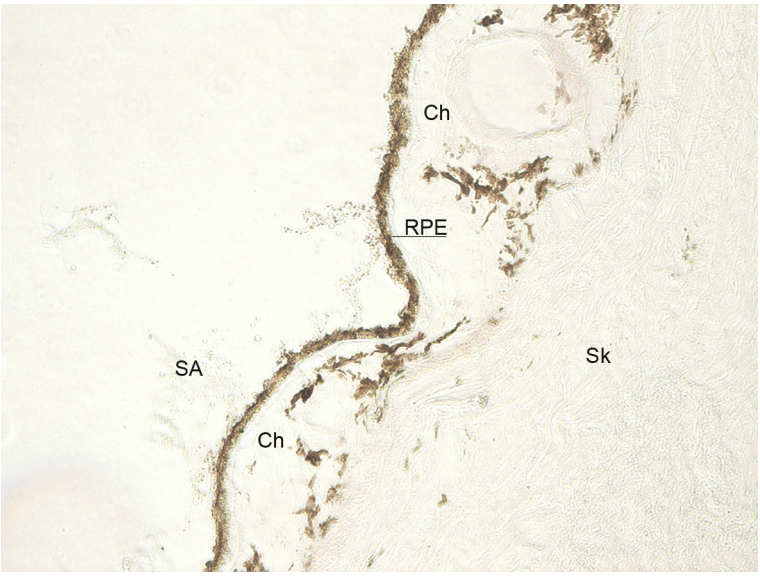


Bild 4.8: Negativkontrolle mit korrespondierendem Blockprotein. Vergr.: 10x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, Sk: Sklera, RPE: Retinales Pigmentepithel

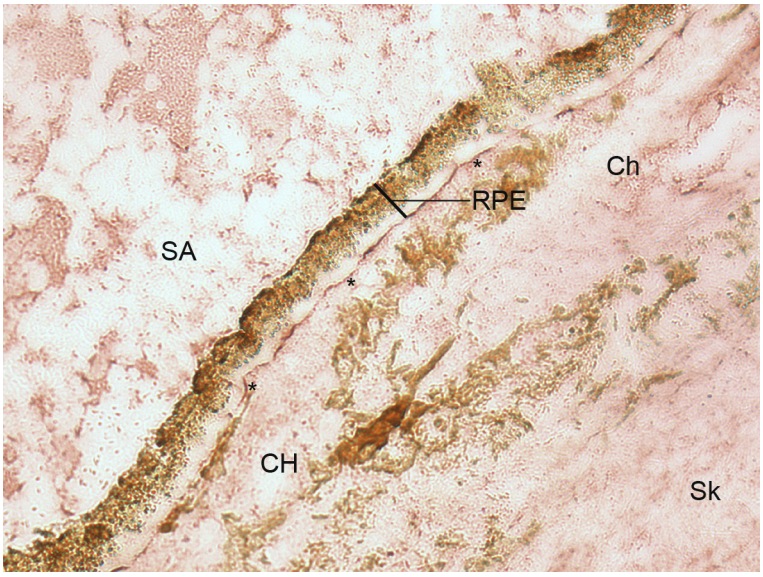


Bild 4.9: Im gesamten Verlauf des RPEs ist eine deutliche Färbelinie im basalen Zellbereich zu erkennen. Vergr.: 100x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, Sk: Sklera, RPE: Retinales Pigmentepithel, angefärbte Kv1.3-Kanäle durch Sterne markiert

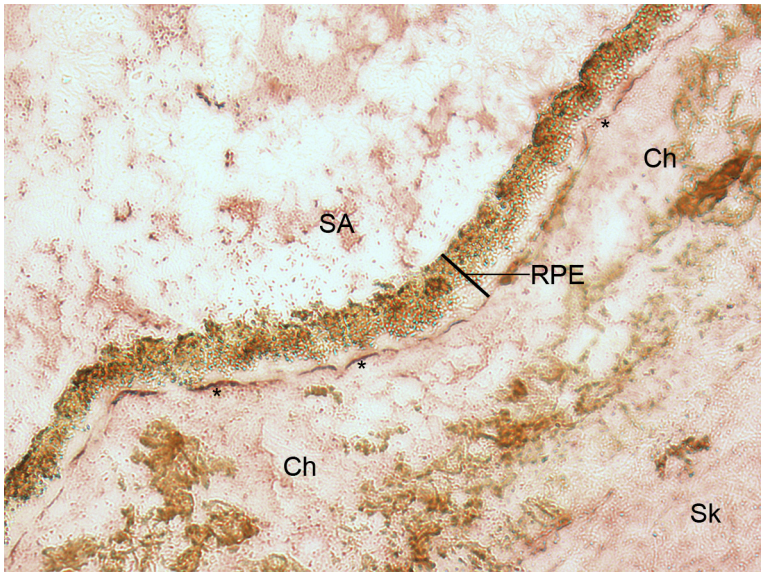


Bild 4.10: Darstellung des Retinalen Pimentepithels mit an der basalen Zellmemban angefärbten Kv1.3-Kanälen. Vergr.: 100x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, Sk: Sklera, RPE: Retinales Pigmentepithel, angefärbte Kv1.3-Kanäle markiert durch Sterne

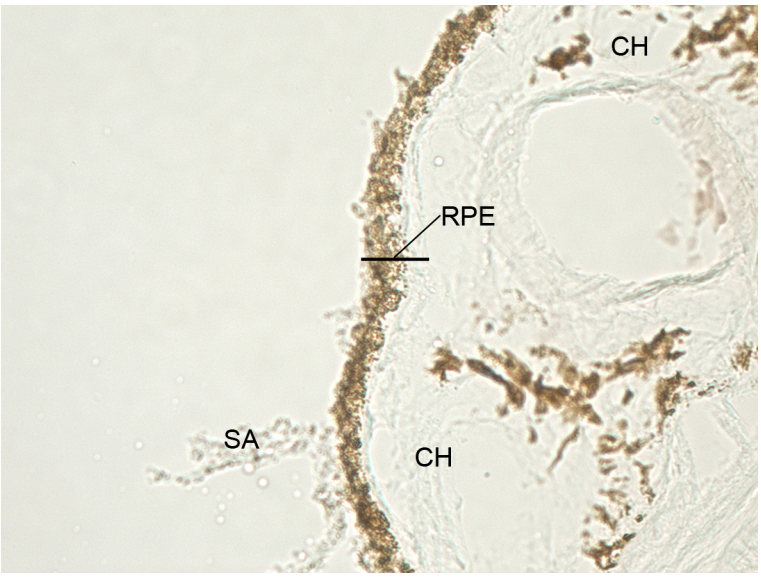


Bild 4.11: Negativkontrolle mit blockierten Primärantikörpern. Vergr.: 20x; SA: Stäbchen-Außensegmente; Ch: Choroidea, RPE: Retinales Pigmentepithel

Bild 4.12: Die RPE-Zellen zeigen eine Anhäufung der Pigmentgranula im mittleren und apicalen Zellbereich; der basale Anteil ist frei. In der basalen und basolateralen Zellmembran sind Kv1.3-Untereinheiten angefärbt. Vergr.: 400x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, RPE: Retinales Pigmentepithel, angefärbte Kv1.3-Kanäle durch Sterne markiert

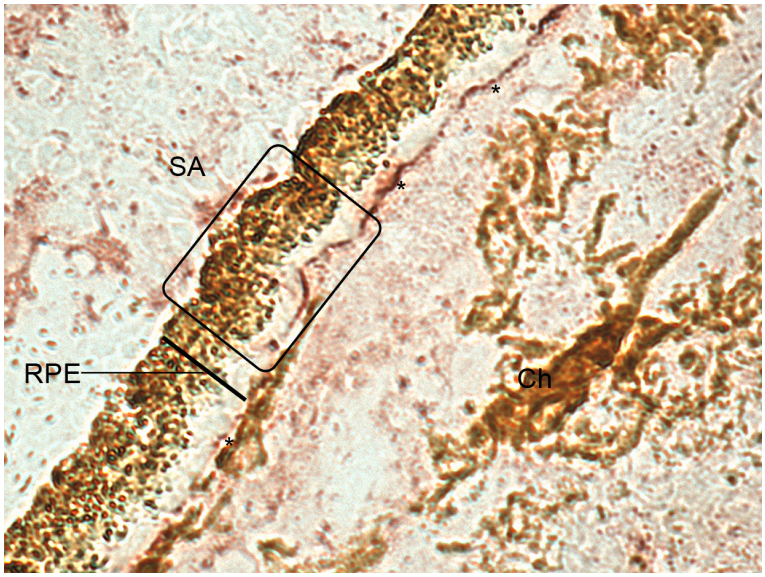


Bild 4.13: Im Ausschnittsbereich sind die Zellgrenzen gut nachvollziehbar. Die angefärbten Kv1.3-Kanäle sind der basalen Zellmembran assoziiert. Vergr.: 400x; SA: Stäbchen-Außensegmente, Ch: Choroidea, RPE: Retinales Pigmentepithel, angefärbte Kv1.3-Kanäle durch Sterne markiert

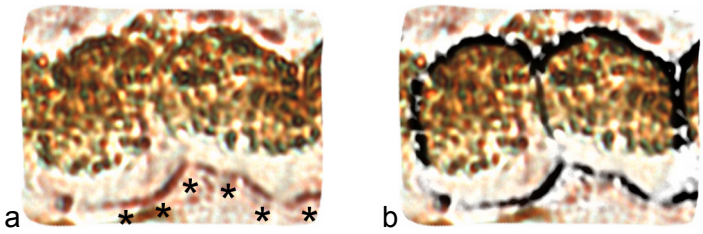


Bild 4.14: Zwei RPE-Zellen im Ausschnitt aus Bild 1.13. a: In der basalen Zellmembran sind die Bereiche mit angefärbten Kv1.3-Kanälen erkennbar; b: Die Zellgrenzen sind im Ausschnittsbereich artifiziell dunkel hervorgehoben.

Bild 4.15: Negativkontrolle mit blockierten Primärantikörpern. Vergr.: 40x; SA: Stäbchen-Außensegmente; Ch: Choroidea, RPE: Retinales Pigmentepithel

4.3 Modifizierung der Färbemethode zur Färbung humaner kultivierter RPE-Zellen

Die Kombination einer Formalinfixierung der kultivierten Zellen mit dem etablierten Färbeprotokoll ergab ein negatives Färberesultat. Nach der Änderung der Fixierung von Formalin zu einer Ethanol/Glycin-Fixierung, konnte eine positive und spezifische Färbung erreicht werden. Eine Konzentration des Primärantikörpers von 1:10 erbrachte die deutlichste Färbeintensität bei niedriger Hintergrundfärbung. Die Zellen zeigen in der Primärkultur (Passage P0) noch vielfach eine epitheloide Morphologie. Die Pigmentierung ist weitestgehend erhalten. Es sind darüber hinaus stark vergrößerte

Zellen mit langen Ausläufern zu finden. Nach der ersten Passage überwiegt eine fibroblastische Zellform, die meisten Zellen haben ihre Pigmentgranula verloren. Ab der dritten Passage schien sich die proliferative Kapazität der Zellen zu verstärken. Die unterschiedlichen Kultursubstrate Gelatine, Kunststoff und Fibronectin schienen relativ wenig Einfluss auf Wachstumsverhalten und Zellmorphologie auszuüben. Es wurden diesbezüglich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kulturen festgestellt. Die Expression von Kv1.3-Untereinheiten konnte bis in die vierte Passage nachgewiesen werden. Neben einer netzartigen, rötlich-braunen Grundfärbung findet sich auch eine punktuelle, über die Zelle verteilte Färbung. Diese tritt in bestimmten Zellbereichen vieler Zellen gehäuft auf, vor allem zirkulär um den Zellkern oder am Zellrand. Im Färbebild unterscheiden sich Zellen mit epitheloider Morphologie von denen mit fibroblastischer Morphologie dadurch, dass im Randbereich epitheloider Zellen ein deutliches Färbeband auftritt. Wenn im Verlauf der Kultivierung der epithelartige Charakter verloren gegangen ist, kommen diese Verstärkungen im Randbereich der Zelle nur noch sehr vereinzelt vor. Im Folgenden wird an ausgewählten Kulturen die Expression der Kv1.3-Kanaluntereinheiten während der Subkultivierung von Passage P0 bis P4 in Abhängigkeit vom Kultursubstrat dargestellt.

RPE-Zellkultur P0, Beschichtung: Gelatine

Die auf Gelatine gezüchteten RPE-Zellen haben im Vergleich zu den Zellkulturen mit anderen Substraten in der Primärkultur noch viele Zellen mit deutlich epithelialem Charakter. Während in der Primärkultur vielfach Zellen mit hexagonaler Zellform und hohem Pigmentgehalt zu finden sind, haben die Zellen aller weiteren Passagen eine eher spindelartige Morphologie mit lang gestreckten, dünnen Ausläufern. Darüber hinaus besitzen die RPE-Zellen der weiteren Subkulturen keine Pigmentgranula mehr. Ab der zweiten Passage setzt eine verstärkte Proliferation ein. Alle Zellen der Kulturen P0 bis P4 sind angefärbt. Die Färbung erstreckt sich über den gesamten Zellleib.

Vielfach erscheint der Kernbereich ausgespart, wobei auch hier angefärbte Strukturen erkennbar sind. Neben einer rötlichen Grundfärbung sind intensivere Färbepunkte zu finden, die sich häufig zirkulär um den Kernbereich anhäufen. Abgesehen von der Primärkultur sind keine Unterschiede im Färbemuster zwischen den Passagen zu erkennen.

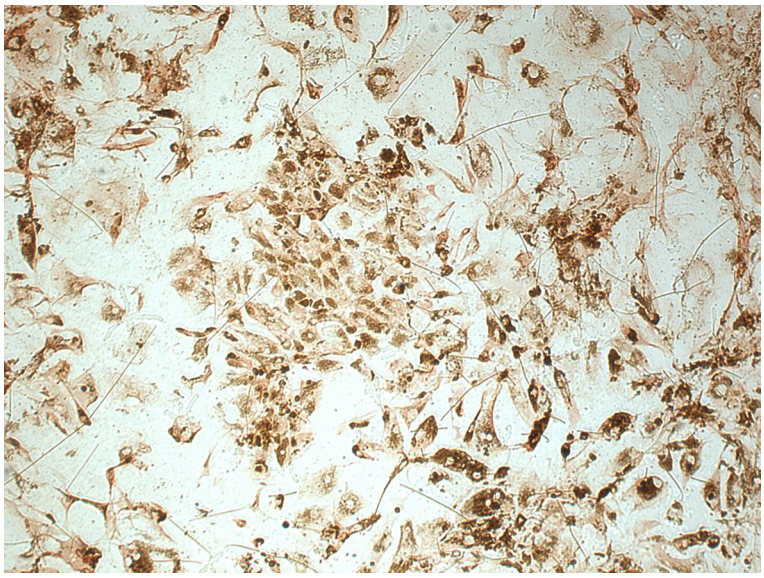


Bild 4.16: Die Zellen der Primärkultur weisen zum Teil, wie in der Bildmitte zu erkennen, einen epitheloiden Wachstumstyp auf. Darüber hinaus sind RPE-Zellen zu finden, die eine fibroblastoide Morphologie zeigen. Die Mehrheit der Zellen besitzt Pigmentgranula. Die Färbung erstreckt sich über den gesamten Zellkörper. Teilweise ist ein Zellkern erkennbar. Vergr.: 40x

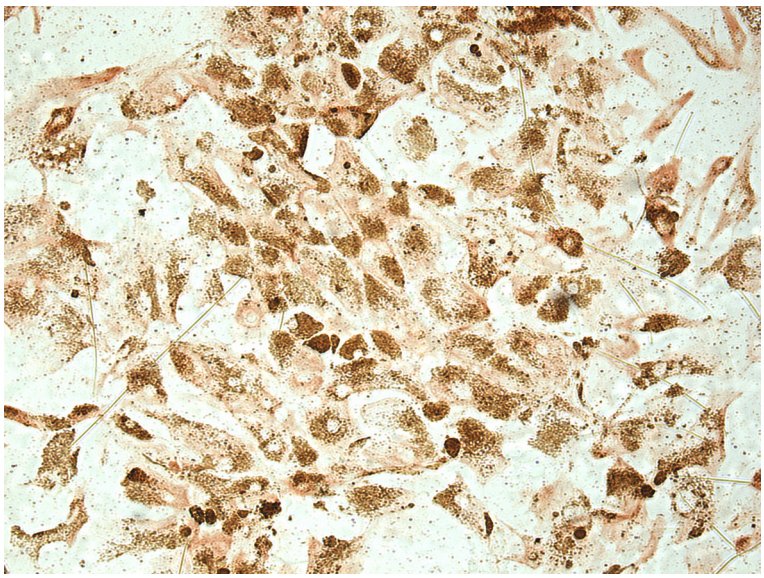


Bild 4.17: Die Färbung erfasst den gesamten Zellkörper, in vielen Zellen scheint der Bereich des Zellkerns jedoch ausgespart zu sein. Vergr.: 100x

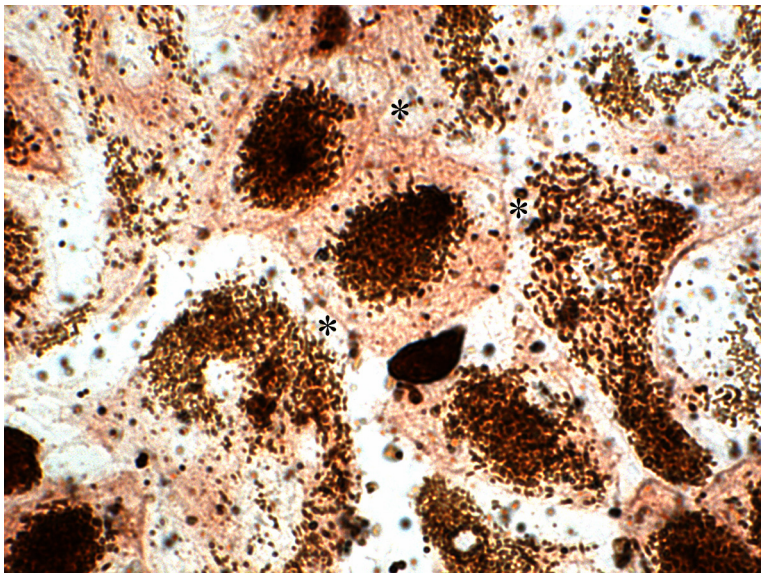


Bild 4.18: Bei stärkerer Vergrößerung wird deutlich, dass die Färbung der Kv1.3-Untereinheiten sich körnig über den ganzen Zellkörper verteilt. Im Bereich der Zellgrenzen ist ein deutliches Färbeband zu erkennen (Stern). Der Zellkern erscheint ausgespart, bei genauerer Betrachtung sind jedoch auch hier leichte immunoreaktive Strukturen erkennbar. ; Vergr.: 400x

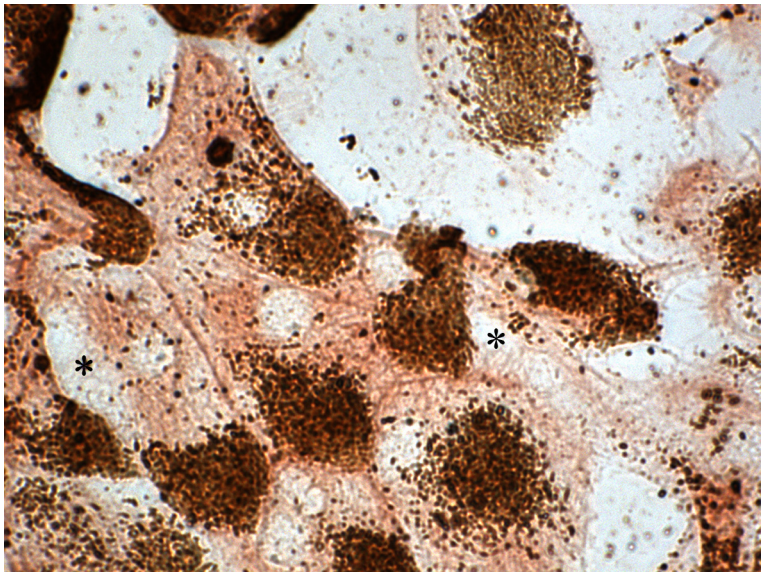


Bild 4.19: Die angefärbten Kv1.3 Untereinheiten bilden neben körnigen auch netzförmige Verteilungsstrukturen aus; die Zellen der P0-Kultur enthalten noch große Mengen an Pigmentgranula. Die hier abgebildeten Zellen zeigen ebenfalls an der Zellgrenze eine dunkelrote Färbelinie. Vergr.: 400x

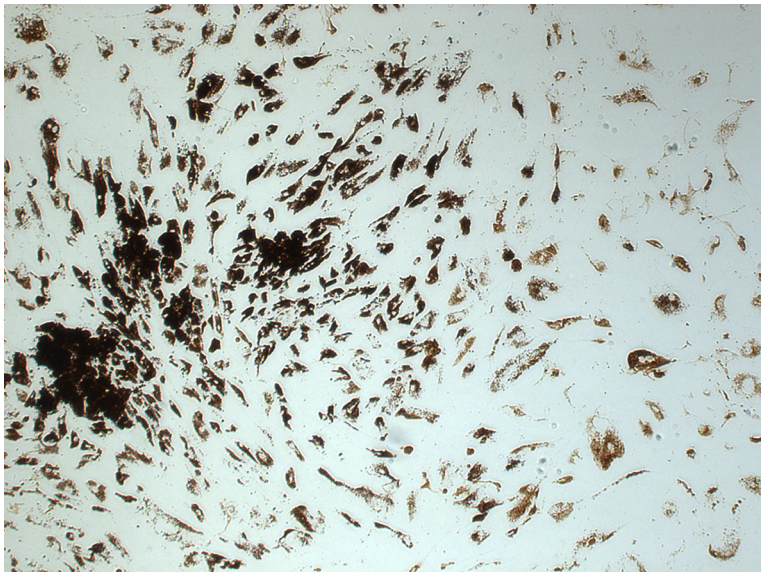


Bild 4.20: Die Negativkontrolle weist keine angefärbten Strukturen auf. Vergr.: 40x

RPE-Zellkultur P1, Beschichtung: Gelatine

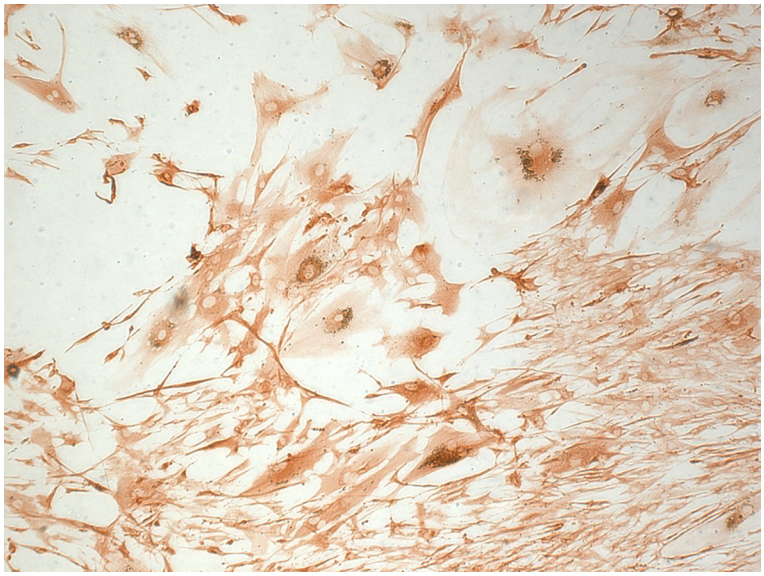


Bild 4.21: Bereits in der P1-Kultur besitzen nur noch wenige RPE-Zellen Pigmentgranula. Der epitheloide Wachstumstyp geht verloren und die Zellen sind elongiert respektive spindelförmig. Darüber hinaus sind „Riesenzellen“ erkennbar, die oft mehrkernig sind und keine Zellteilung mehr durchlaufen. Vergr.: 40x

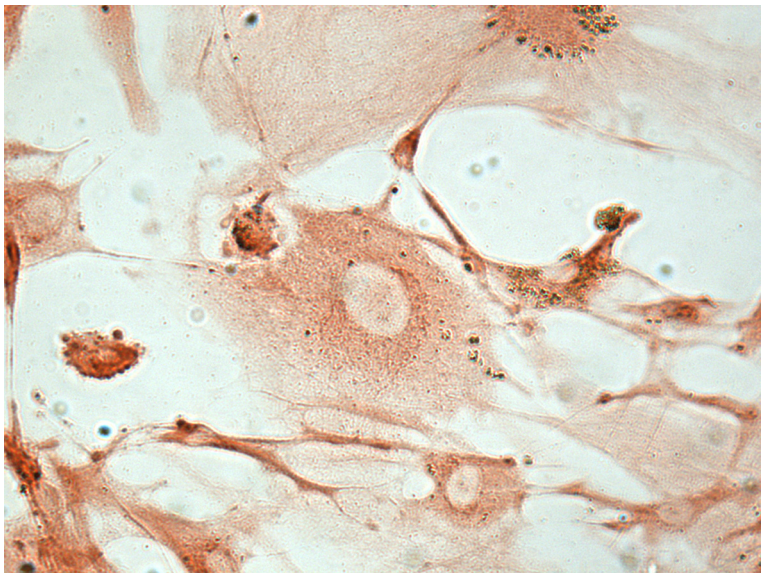


Bild 4.22: Trotz unterschiedlicher Morphologie, sind Kv1.3 Untereinheiten in allen Zellen angefärbt. Die RPE-Zelle in der Bildmitte weist körnige angefärbte Strukturen auf. Der Bereich des Zellkerns stellt sich heller dar, während die direkte Umgebung eine höhere Dichte an Kv1.3 Untereinheiten besitzt. Die Dichte nimmt zur Zellperipherie hin ab. Die Zellgrenze ist undeutlich. Die kleineren spindelförmigen RPE-Zellen sind relativ kräftig gefärbt. Vergr.: 200x

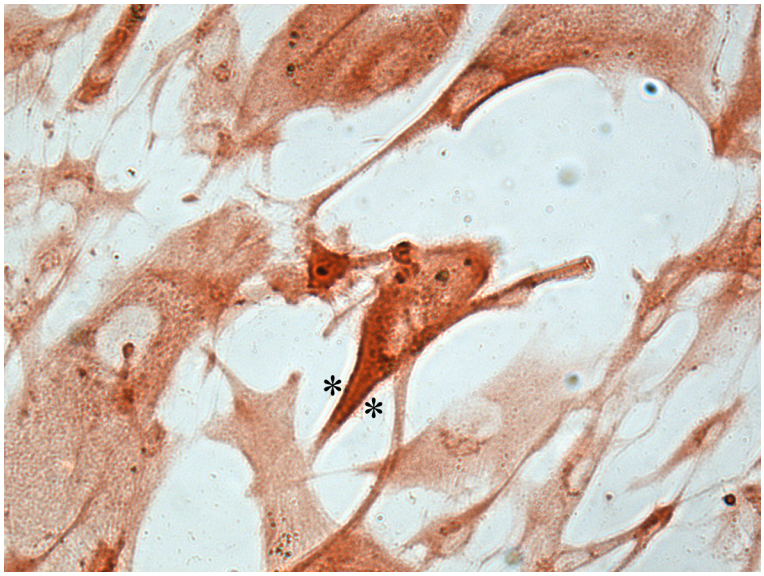


Bild 4.23: Neben Ausläufern von seneszenten Riesenzellen ist in der Bildmitte eine relativ stark angefärbte, elongierte Zelle zu erkennen. Der Zellkörper ist komplett in einer punktuellen Verteilung angefärbt. Im Bereich der Zellgrenze, speziell im Ausläufer, erstreckt sich ein stärker angefärbtes Band (Stern). Vergr.: 200x

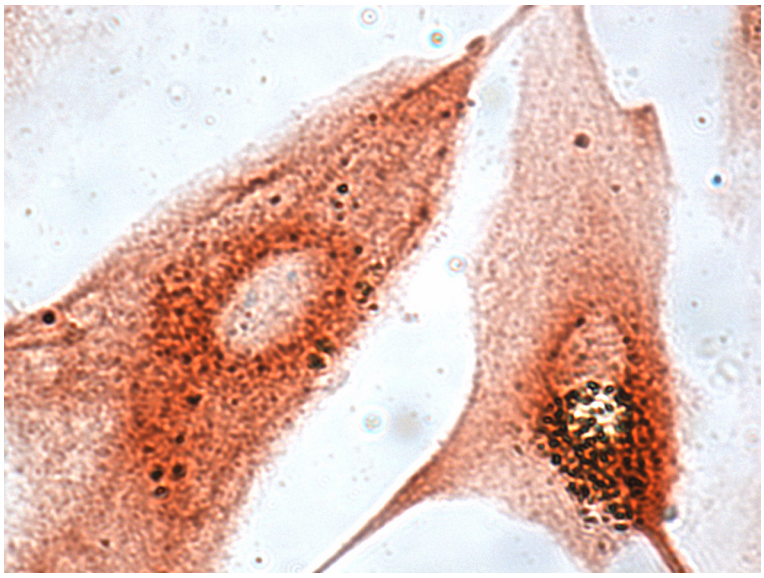


Bild 4.24: Die rechte Zelle im Bild besitzt Pigmentgranula, die typischerweise um dem Kern herum angeordnet sind. Zirkulär des Zellkerns liegt ebenfalls eine erhöhte Dichte an Kv1.3-Untereinheiten vor. Vergr.: 400x

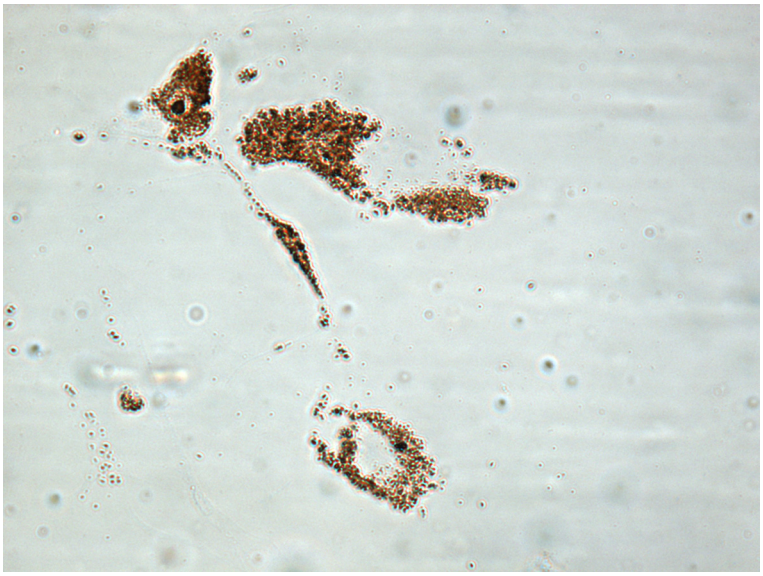


Bild 4.25: Das Bild zeigt die Negativkontrolle. Lediglich die Pigmentgranula sind zu erkennen. Vegr.: 200x

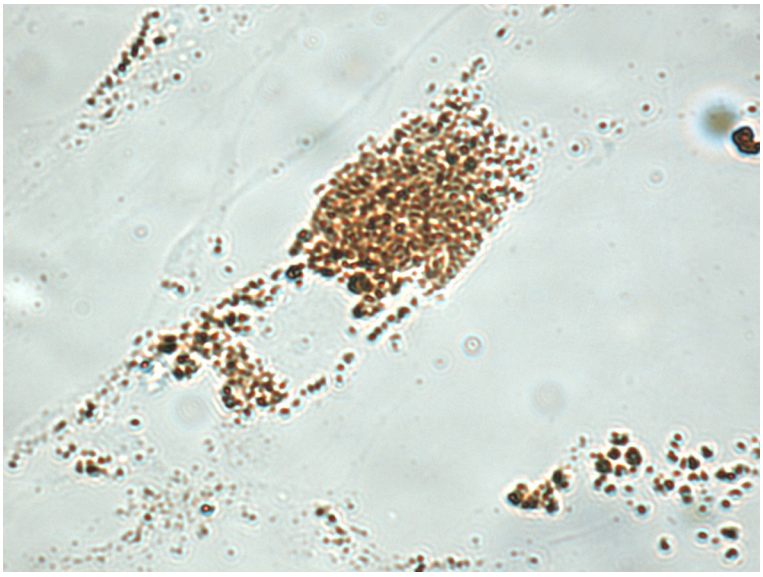


Bild 4.26: Auch diese Negativkontrolle ist ohne jegliche Anfärbung. Die Pigmentgranula der RPE-Zellen lassen einen Zellumriss erahnen. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P2, Beschichtung: Gelatine

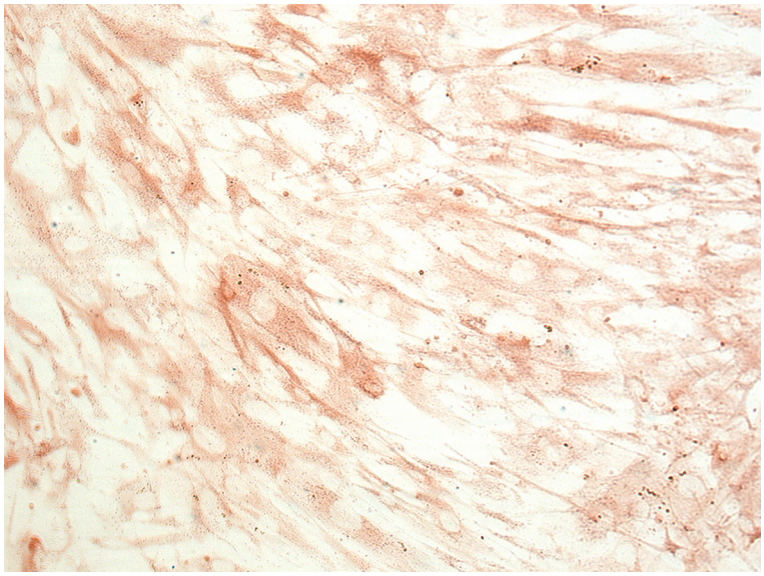


Bild 4.27: In der Übersichtsaufnahme ist zu sehen, dass in der 2. Passage die RPE-Zellen keinen Epithelcharakter mehr besitzen. Die Zellen sind lang gestreckt und bilden dünne Zellausläufer aus. Teilweise wachsen die Zellen übereinander. Es sind nur noch sehr vereinzelt Pigmentgranula vorhanden. Die Färbung der Kv1.3 Kanäle bedeckt den gesamten Zellkörper, wobei der Bereich des Zellkerns ausgenommen scheint. Man kann Zellen mit stärkerer und schwächerer Färbung unterscheiden. Hierbei ist jedoch keine Korrespondenz mit bestimmten Merkmalen (z.B. Form oder Größe) vorhanden. Vergr.: 100x

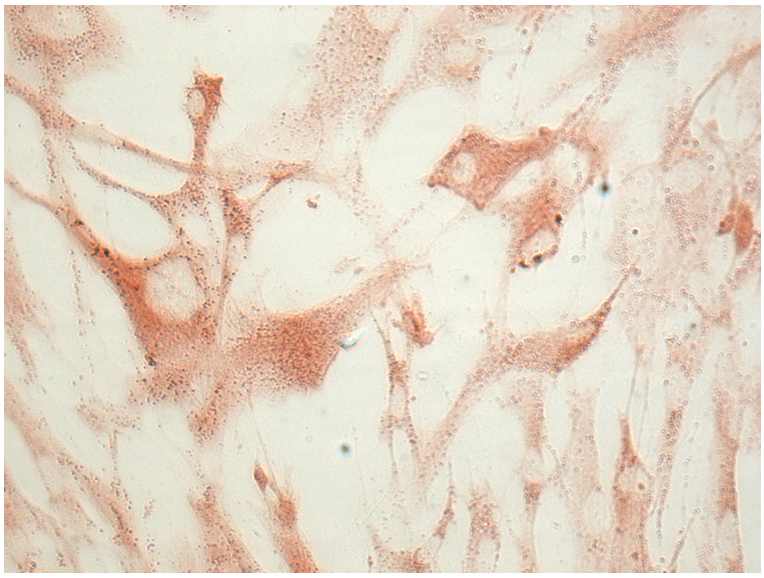


Bild 4.28: Die im Bild dargestellten RPE-Zellen besitzen eine teils schwache und teils deutliche rötliche Grundfärbung. Der Zellkern ist immer als hellerer Bereich erkennbar.

Über die Grundfärbung hinaus gibt es punktförmige Anfärbungen. Zellen mit stärkerer Grundfärbung besitzen auch einen höheren Anteil an dunkelroten Punkten. Die Dichte dieser Punkte nimmt zur Peripherie hin ab. Es sind keine bandförmigen Anfärbungen am Zellrand erkennbar. Vergr.: 200x

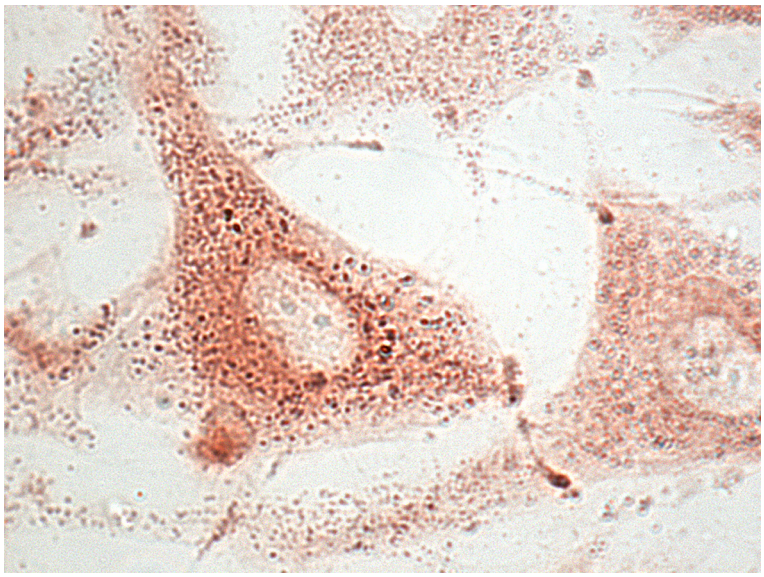


Bild 4.29: Die Dichte punktförmiger Färbungen ist im Bereich um den Zellkern höher als am Zellrand. In dieser Vergrößerung ist erkennbar, dass auch im Bereich des Kerns die streuselartige Struktur der Anfärbung vorhanden ist. Angefärbte Kv1.3-Kanäle sind ebenfalls in den Zellausläufern zu finden. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P3, Beschichtung: Gelatine

Bild 4.30: In der dritten Passage zeigen die RPE-Zellen eine starke Proliferation. Sie wachsen dicht nebeneinander mit der gleichen Ausrichtung. Einige Zellen wachsen jedoch auch übereinander. In dieser Passage sind ebenfalls alle Zellen angefärbt, die Kernbereiche erscheinen ausgespart. Vergr.: 40x

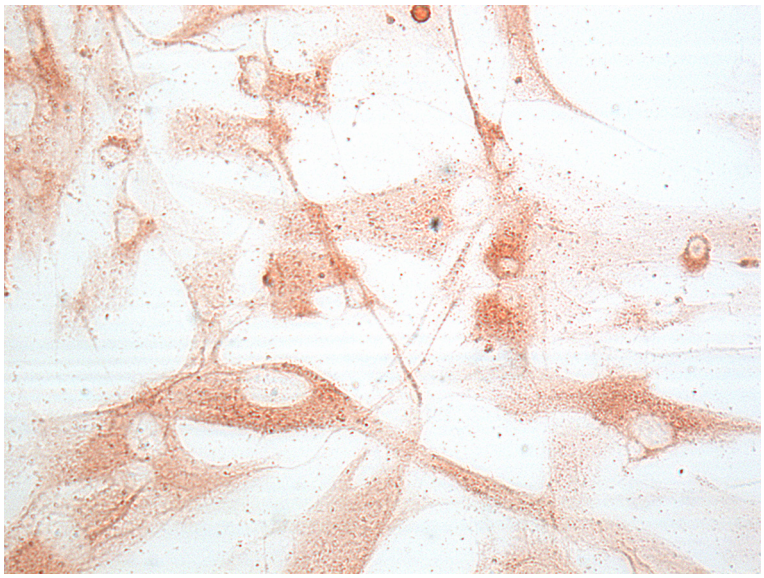


Bild 4.31: In der Färbung ist keine Veränderung zu den vorherigen Passagen erkennbar. Die Dichte und Verteilung der Kv1.3-Kanäle ist unverändert. Vergr.: 200x

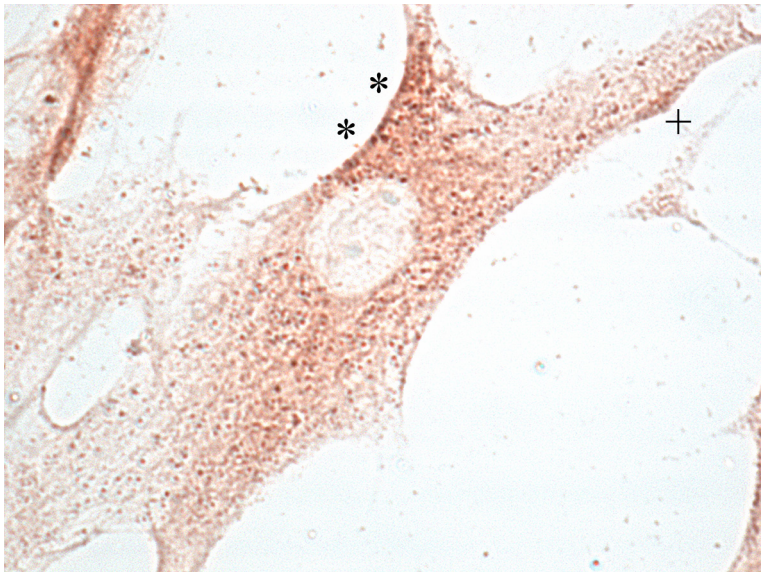


Bild 4.32: Die abgebildete Zelle hat eine längliche Form mit mehreren Ausläufern. Der Zellkern ist deutlich erkennbar, auch über dem Kern ist eine schwache punktuelle Färbung zu erkennen. Die Dichte der gefärbten Kalium-Kanäle ist im Zellzentrum am höchsten. Im oberen Bildanteil ist im Bereich der Zellgrenze eine Verdichtung der Kv1.3-Kanäle zu finden (Stern). Eine weitere Anhäufung ist an einer knotig erscheinenden Zellstruktur im Ausläufer erkennbar. Hier hat sich ein kleiner Hügel ausgebildet (Plus). Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P4, Beschichtung: Gelatine

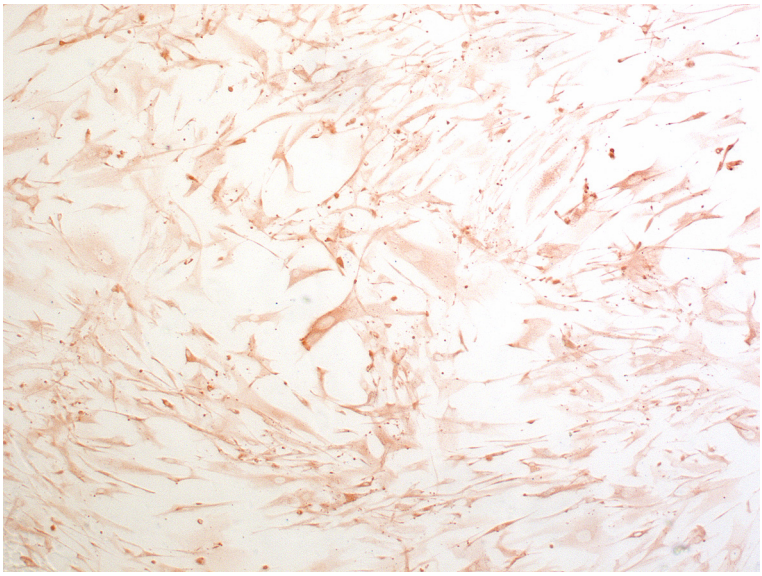


Bild 4.33: Die Zellen der vierten Subkultur sind nicht mehr so dicht gewachsen wie die der dritten. In ihrer Morphologie sind sie hingegen unverändert. Alle Zellen weisen eine Färbung auf, wobei einige intensiv und andere weniger intensiv markiert sind. Vergr.: 40x

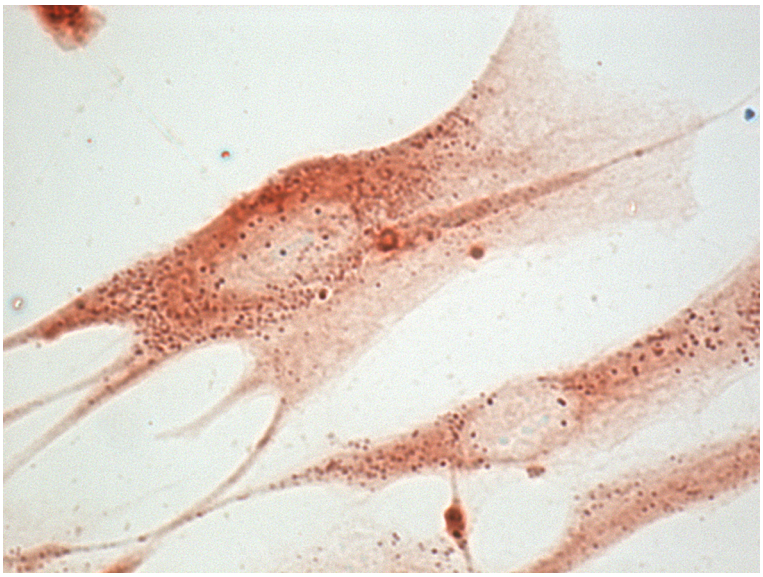


Bild 4.34: Auch in der vierten Passage ist das Färbebild konstant. Die Kv1.3-Untereinheiten sind über den gesamten Zellkörper der abgebildeten Zellen abgebildet. Um den Zellkern herum ist die Färbung intensiver. Dunkelrote Punkte sind auch über dem Zellkern zu erkennen. Es sind viele dunkelrote Punkte im Zellzentrum zu finden, während ihre Anzahl in der Peripherie der Zelle abnimmt. In diesen Bereichen erscheint das Färbemuster eher netzartig. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P0, Beschichtung: Fibronektin

Die auf Fibronektin gezüchteten RPE-Zellen verlieren bereits in der Primärkultur weitestgehend ihre epithelialen Merkmale. Dies äußert sich in einer lang gestreckten Zellform mit zahlreichen Ausläufern, ungeordneter Verteilung und dem Verlust der Kontakthemmung benachbarter Zellen, die demzufolge auch übereinander wachsen. Die Pigmentierung bleibt gegenüber den anderen Kulturbeschichtungen länger erhalten, so sind bis in die zweite Subkultur Pigmentgranula zu finden. Die Proliferationsrate ist vergleichsweise leicht erhöht. Die RPE-Zellen sind durchgängig bis zur P4-Kultur gefärbt. Dabei zeigt sich wie bei den anderen Kulturen eine relativ gleichmäßige Grundfärbung, übersät mit dunkelroten Färbepunkten. Der Zellkern scheint von der Färbung ausgenommen, wobei auch in diesem Bereich bei stärkerer Vergrößerung zarte immunoreaktive Strukturen erkennbar sind. Zirkulär um den Zellkern ist die Färbung vielfach intensiver als in der Zellperipherie.

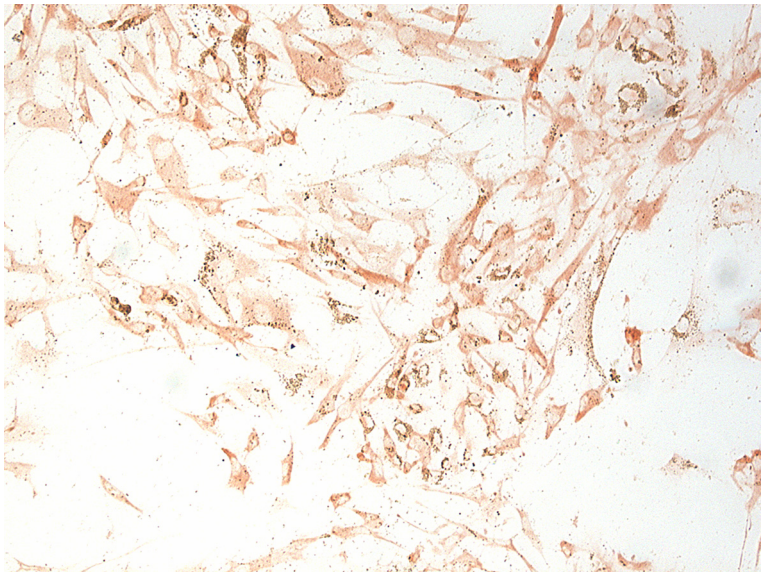


Bild 4.35: Die Zellen dieser Primärkultur haben bereits die meisten Charakteristika des Wachstumstyps von RPE-Zellen in situ verloren. Sie sind lang gestreckt mit vielen Ausläufern und ungeordnet verteilt. Die Zellen weisen eine rötliche Färbung unterschiedlicher Intensität auf. Im Bereich des Zellkerns erscheint die Färbung ausgespart. Die Pigmentierung ist weitestgehend erhalten. Vergr.: 10x

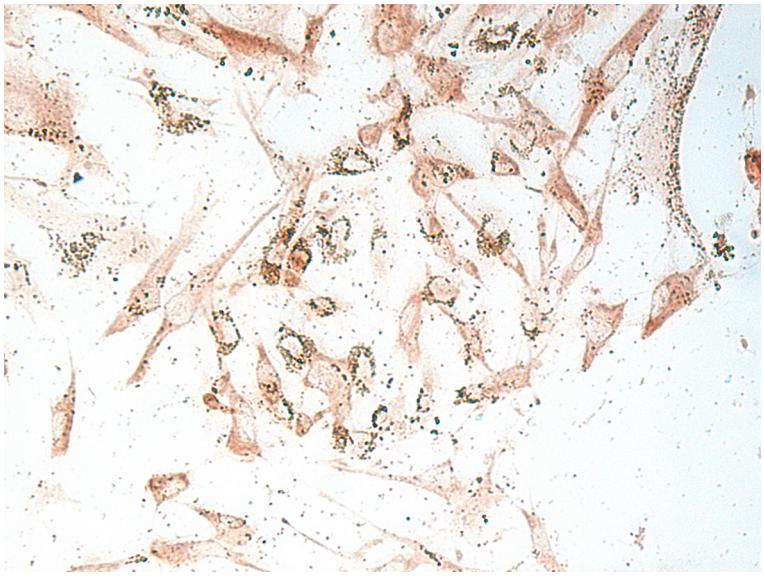


Bild 4.36: Während einige RPE-Zellen relativ intensiv gefärbt sind, gibt es ebenfalls Zellen mit sehr schwacher Färbung. Die Intensität der Färbung ist jedoch nicht mit der Morphologie assoziierbar. Vergr.: 100x

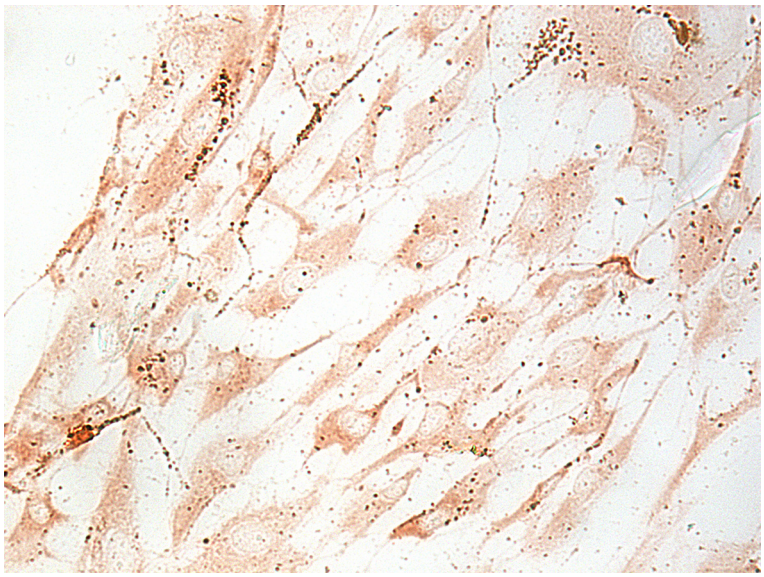


Bild 4.37: Dieser Ausschnitt der Zellkultur zeigt Zellen, die eine überwiegend gleiche Färbeintensität aufweisen. Die Zellen haben eine leicht elongierte Morphologie mit langen Ausläufern. Der Zellkern ist in der Regel deutlich abgegrenzt, während der Rest des Zellleibs relativ homogen angefärbt ist. In einigen Zellen liegt verstärkte Immunoreaktivität im Randbereich und den Ausläufern vor. Vergr.: 200x

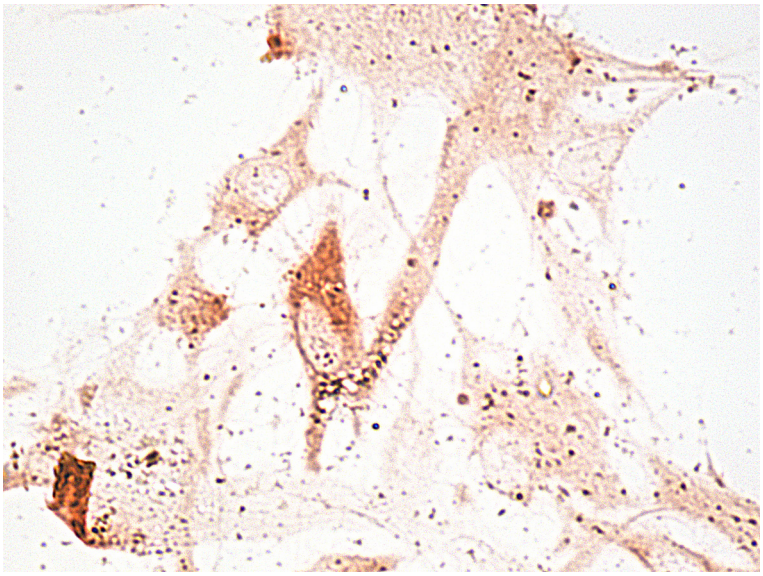


Bild 4.38: Verglichen mit den umgebenden Zellen ist die Zelle im Bildzentrum deutlich stärker gefärbt. Im Bereich des Zellkerns ist die Färbung weniger intensiv. Vergr.: 400x

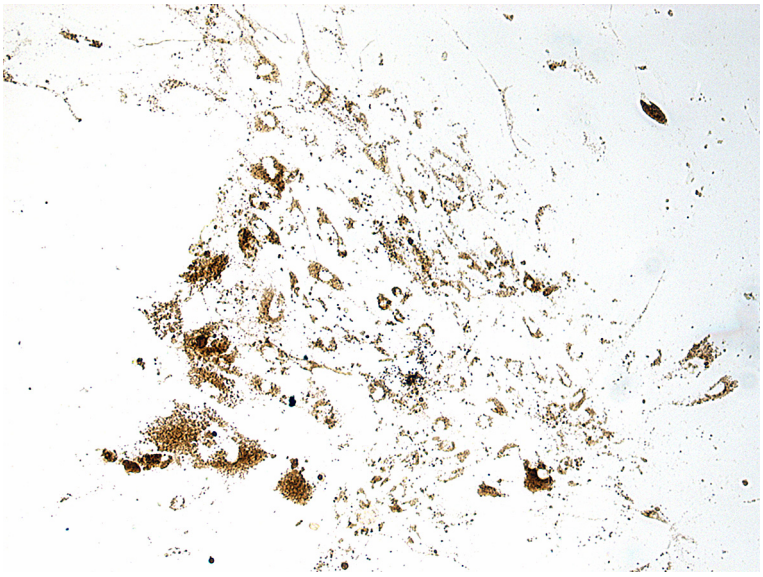


Bild 4.39: In der Negativkontrolle ist keine Färbung erkennbar. Vergr.: 40x

RPE-Zellkultur P1, Beschichtung: Fibronektin

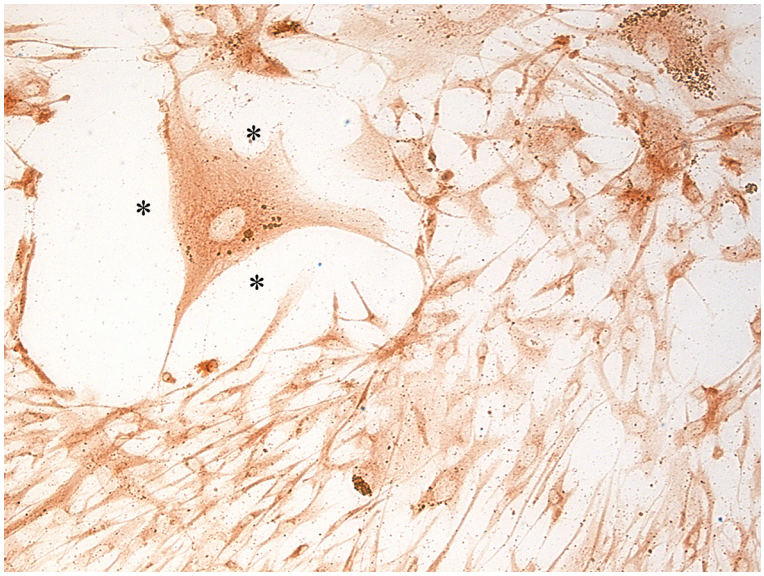


Bild 4.40: Die überwiegende Zahl der abgebildeten Zellen weist einen spindelförmigen Wachstumstyp auf. Die markierte Riesenzelle ist um ein vielfaches größer als die restlichen im Bild zu sehenen Zellen. Es ist jedoch kein Unterschied in der Art der Anfärbung erkennbar. Vergr.: 100x

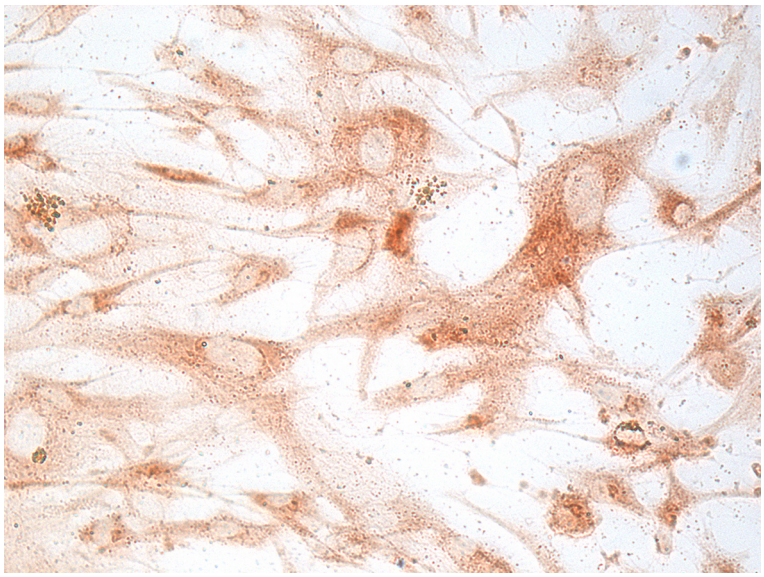


Bild 4.41: Die abgebildeten Zellen überwachsen sich gegenseitig mit ihren Ausläufern. Alle Zellen weisen Kv1.3-Untereinheiten auf. Vergr.: 200x

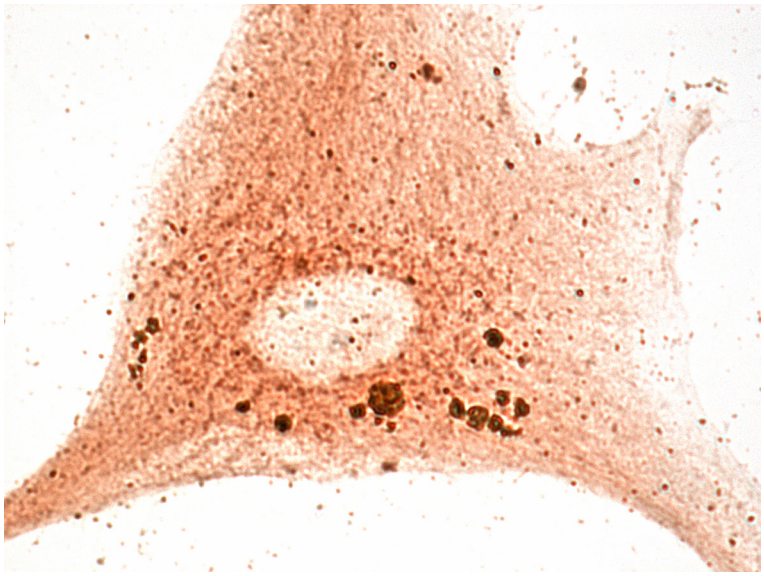


Bild 4.42: Neben vereinzelten Pigmentgranula sind die Kv1.3-Kanäle, als körnige Struktur angefärbt, deutlich erkennbar. Es ist eine Konzentration der Kanäle zirkulär des Zellkerns zu sehen. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P2, Beschichtung: Fibronektin

Bild 4.43: Die im Bild zu sehenden Zellen haben vorwiegend eine spindelförmige Morphologie. Alle weisen eine Färbung auf, wenige haben Ihre Pigmentierung behalten. Die Zellen haben teilweise eine hohe Größendifferenz. Vergr.: 100x

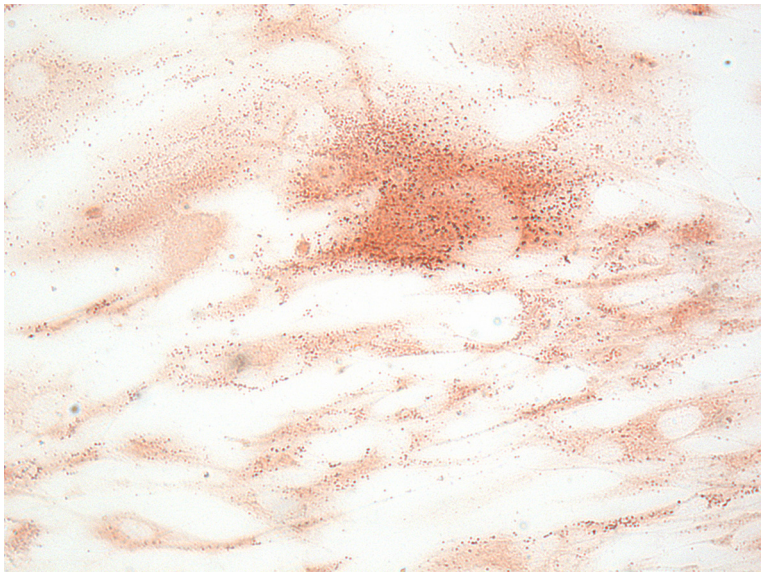


Bild 4.44: Die gefärbten Kanäle sind neben einer zarten, leicht körnigen Zellfärbung auch verstärkt als dunkle, rot-braune Punkte erkennbar. Alle abgebildeten Zellen weisen Kv1.3-Kaliumkanäle auf. Vergr.: 200x

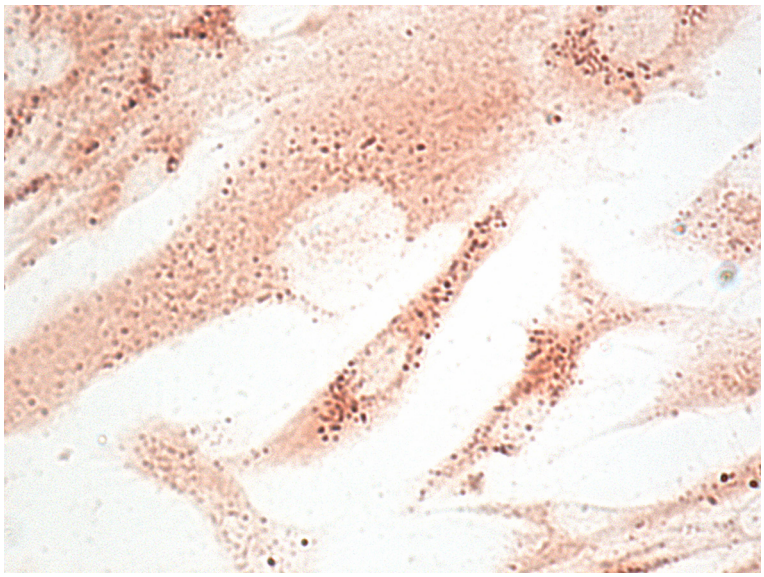


Bild 4.45: Die kleine spindelförmige Zelle im Bildzentrum besitzt eine höhere Dichte an Kv1.3-Kanälen als die darüber liegende, weitaus größere Zelle. Neben der rötlichen Grundfärbung fallen körnige rot-braune Verdichtungen auf, die sich über den gesamten Zellleib verteilen. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P3, Beschichtung: Fibronektin

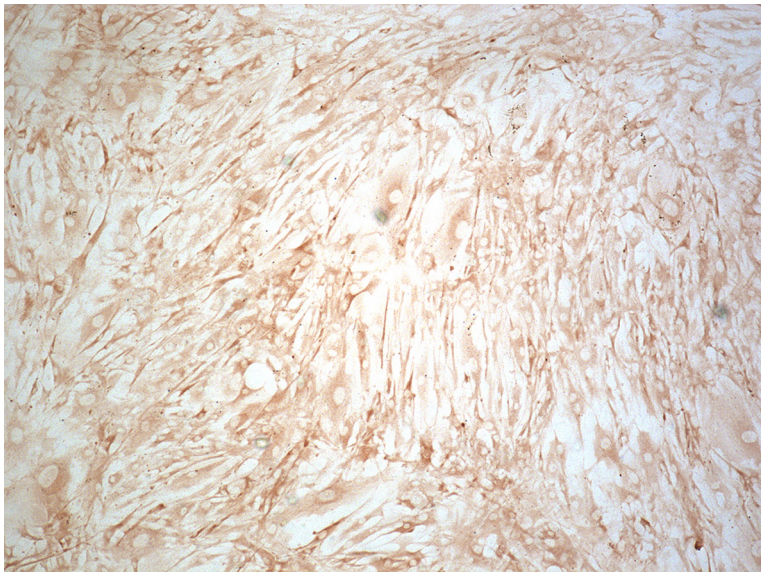


Bild 4.46: Die Übersicht zeigt eine konfluente Kultur; die überwiegende Zahl der Zellen besitzt einen fibroblastischen Wachstumstyp. Weiterhin sind Zellen mit mesenchymalen Charakteristika und übergroße RPE-Zellen erkennbar. Kv1.3-Kanäle sind in allen Zellen nachweisbar. Vergr.: 40x

Bild 4.47: Viele Zellen der Kultur zeichnen sich durch sehr lange Ausläufer aus. Einige besitzen eine intensivere Färbung als andere. Vergr.: 100x

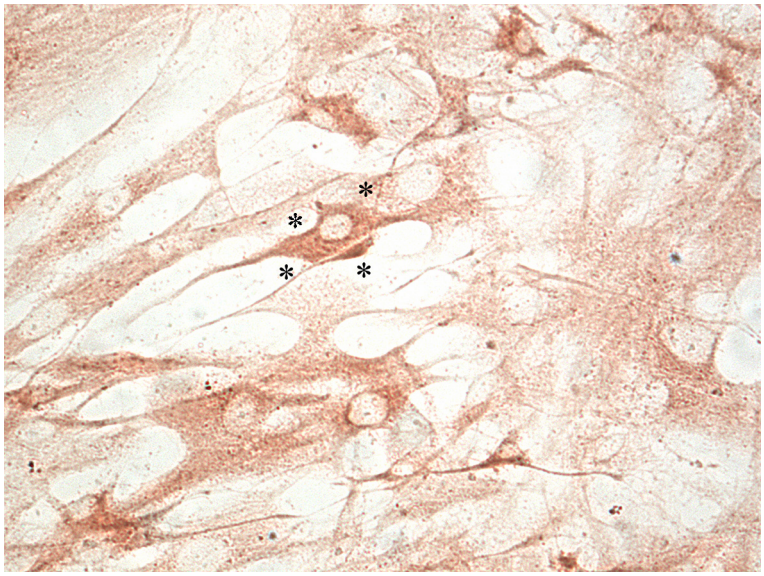


Bild 4.48: Die markierte Zelle im Bildzentrum (Sterne) ist deutlich intensiver gefärbt als die meisten anderen im Bild. Sie hat einen langen Ausläufer ausgebildet. Vergr.: 200x

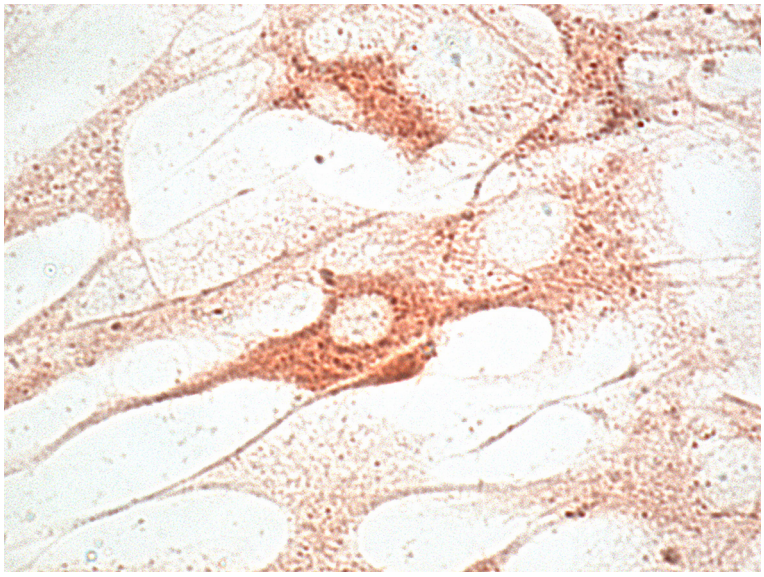


Bild 4.49: Die Zelle im Bildzentrum besitzt eine erhöhte Dichte an Kv1.3-Kanälen. Die Färbung weist eine stark körnige Struktur auf; der Kernbereich scheint ausgespart, wobei auch hier zarte Immunoreaktivität vorliegt. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P4, Beschichtung: Fibronektin

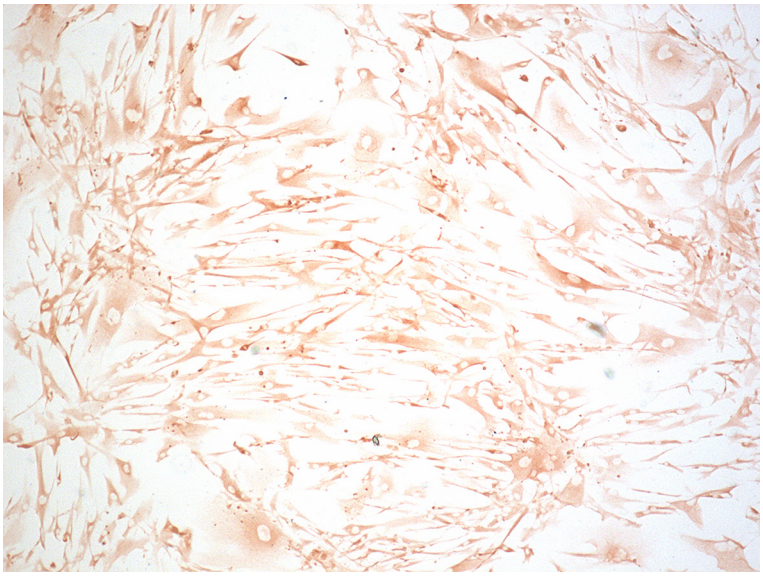


Bild 4.50: Die Proliferationsrate hat nach der vierten Passage deutlich abgenommen, erkennbar an der relativ geringen Zelldichte der Kultur. Die Zellen sind stark vergrößert und lang gestreckt. Alle im Ausschnitt abgebildeten Zellen sind mit unterschiedlicher Intensität rötlich gefärbt. Vergr.: 40x

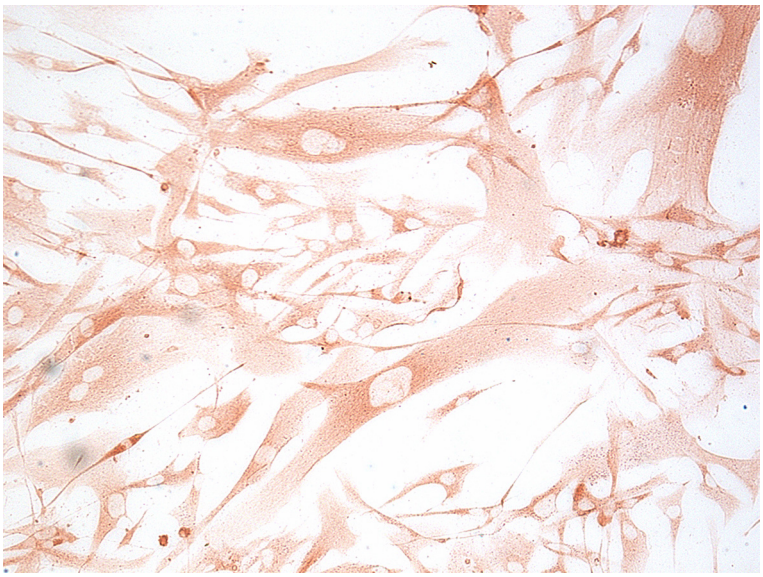


Bild 4.51: Trotz unterschiedlicher Morphologie der abgebildeten Zellen weisen alle Kv1.3-Kanäle auf. Die rötliche Grundfärbung zieht sich netzartig über die Zellkörper, mit Verdichtungen im Bereich um den Zellkern und vereinzelt am Zellrand. Darüber hinaus sind körnige Strukturen erkennbar. Der Zellkern ist deutlich abgegrenzt, wobei auch hier eine leichte Färbung vorliegt. Vergr.: 100x

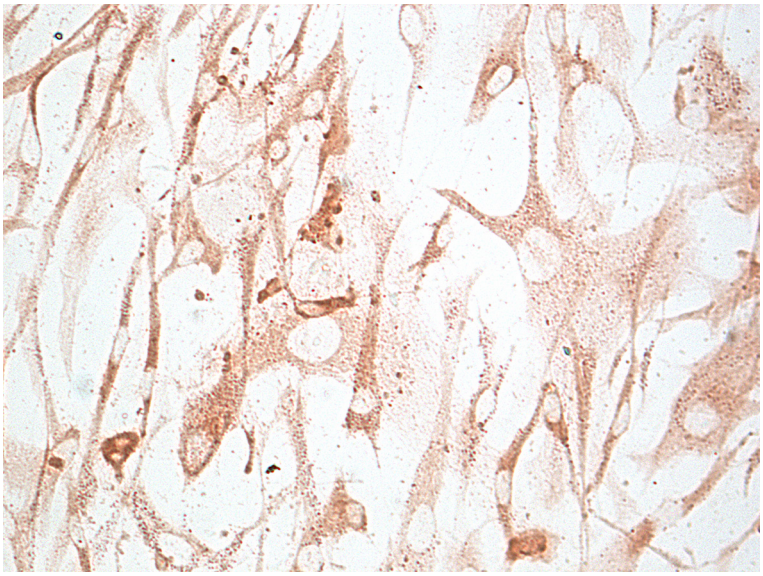


Bild 4.52: Die RPE-Zellen exprimieren weiterhin Kv1.3 Untereinheiten, deutlich an der streuselartigen Färbung erkennbar. In diesem Bild tritt die körnige Anfärbung deutlicher gegenüber der netzartigen Grundfärbung hervor. Die Intensität der Immunoreaktivität ist bei einigen Zellen deutlich stärker als bei anderen. Je kleiner die Zellen sind, umso ausgeprägter erscheint die Färbung. Vergr.: 200x

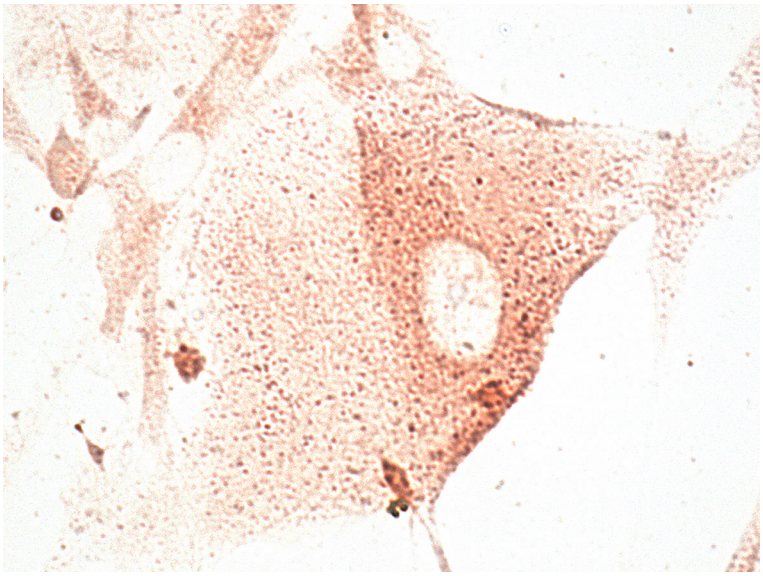


Bild 4.53: Die Kalium-Kanäle sind über die gesamte abgebildete Zelle verteilt, in Kernnähe und vereinzelt im Randbereich ist die Dichte jedoch erhöht. Leicht körnige Anfärbungen sind ebenfalls im Kernbereich erkennbar. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P0, ohne Beschichtung

Die Zellen der Primärkultur zeigen nur noch in Ansätzen einen epitheloiden Wachstumstyp. Sie sind zum Teil relativ lang gestreckt und haben vielfach den engen Kontakt zu benachbarten Zellen aufgehoben. Der Pigmentierungsgrad liegt noch relativ hoch. Nach der ersten Subkultivierung ist die Pigmentierung jedoch nahezu vollständig verloren. In allen Kulturen sind Kv1.3 –Untereinheiten nachzuweisen. Im Bereich der Zellkerne scheint die Färbung schwächer zu sein, es sind jedoch auch Zellen zu finden, bei denen auch über dem Zellkern vergleichsweise viele Färbepunkte erkennbar sind.

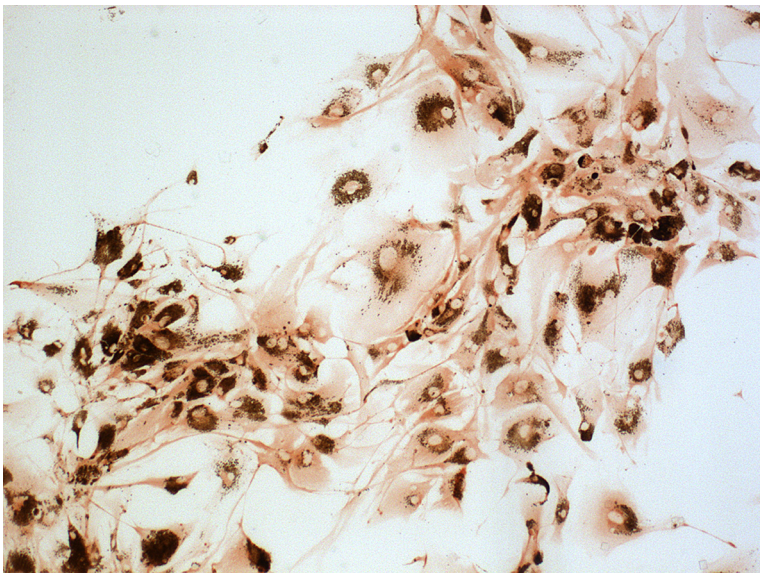


Bild 4.54: Die RPE-Zellen zeigen in der P0-Kultur ansatzweise einen epitheloiden Wachstumtyp. Der Pigmentgehalt ist relativ hoch. Alle im Bild zu sehenen Zellen weisen eine Färbung auf. Hierbei ist eine Kernabgrenzung und eine stärkere Färbeintensität um den Kern herum erkennbar. Vergr.: 100x

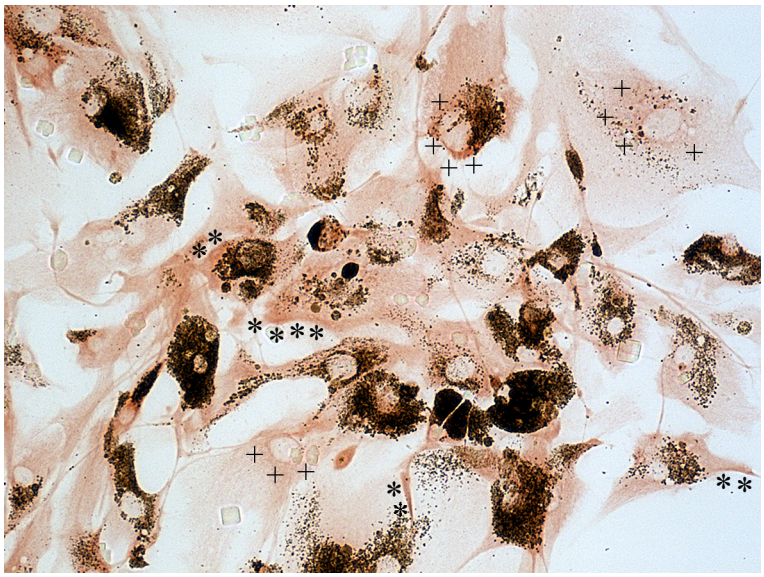


Bild 4.55: Es sind in diesem Bild zwei unterschiedliche Verteilungsmuster der angefärbten Bereiche zu erkennen: Es gibt Zellen, die an Teilen der Zellgrenze oder in ihren Ausläufern stärker gefärbt sind (Stern) während andere RPE-Zellen eine höhere Färbeintensität in direkter Nähe des Zellkerns zeigen (Plus). Vergr.: 200x

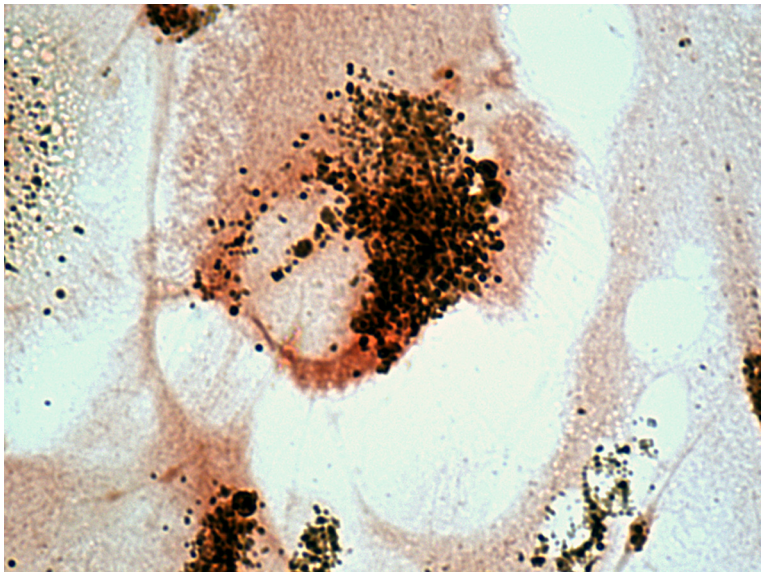


Bild 4.56: Die Struktur der Färbung stellt sich teils körnig, teils retikulär dar. Vergr.: 400x

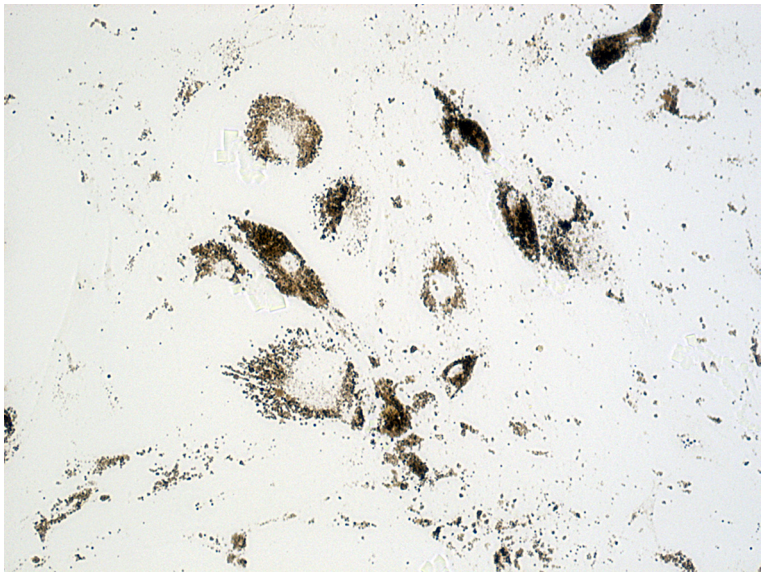


Bild 4.57: Die Negativkontrolle ist ohne Färbung. Vergr.: 200x

RPE-Zellkultur P1, ohne Beschichtung

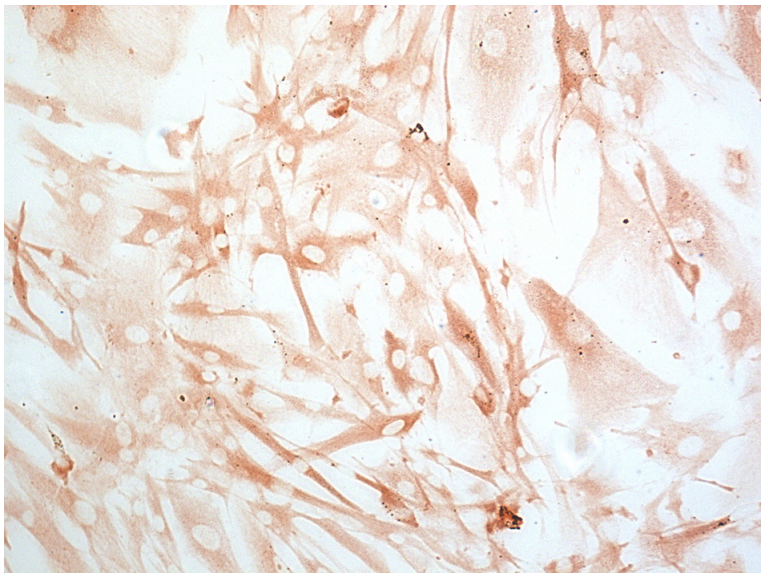


Bild 4.58: Die Zellen wachsen ungeordnet und teilweise übereinander. Sie sind oftmals stark vergrößert, lang gestreckt und besitzen mehrere Ausläufer. Die Färbung ist unterschiedlich stark ausgeprägt, die Zellkernbereiche scheinen in dieser Übersicht ausgespart. Vergr.: 100x

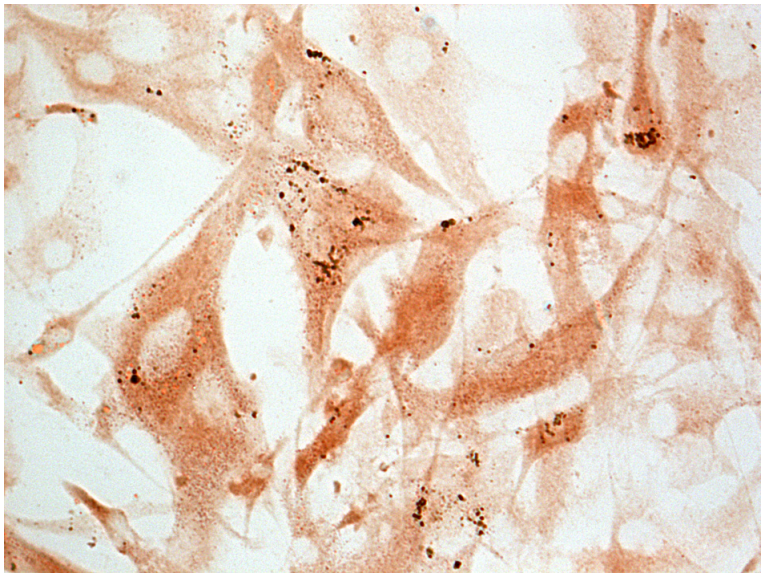


Bild 4.59: Neben relativ blass gefärbten RPE-Zellen, sind Zellen mit intensiver Färbung zu erkennen. In beiden Fällen ist die Struktur der Färbung körnig. Einige Zellen enthalten einen Restgehalt an Pigmentgranula. An einigen Zellen ist auch über dem Kern eine zarte Färbung erkennbar. Vergr.: 200x

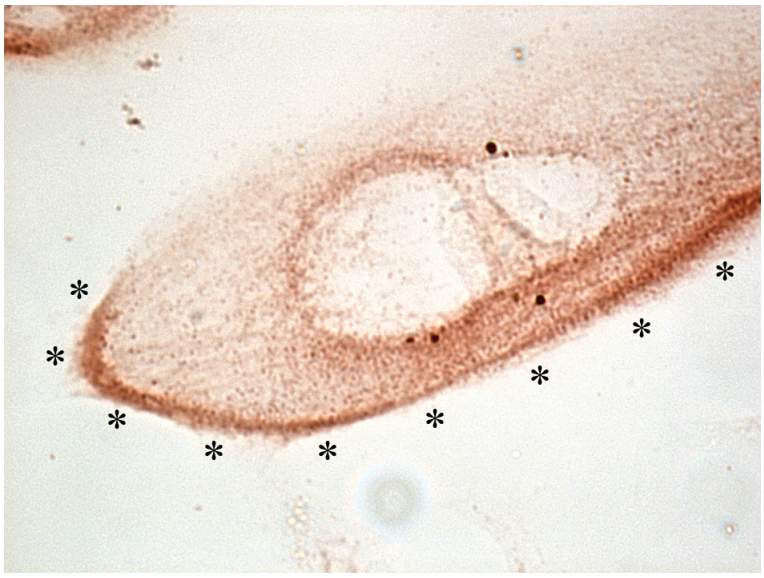


Bild 4.60: Im Bild ist eine RPE-Zelle dargestellt, deren Kern einen geteilten Eindruck vermittelt. Die Kv1.3-Kanäle sind als dunkelrote Punkte deutlich zu erkennen. Die Zellgrenze weist zum Teil eine starke Verdichtung an Kv1.3-Kanälen auf (Stern). Darüber hinaus ist die direkte Umgebung des Zellkerns stärker angefärbt. Vergr.: 400x

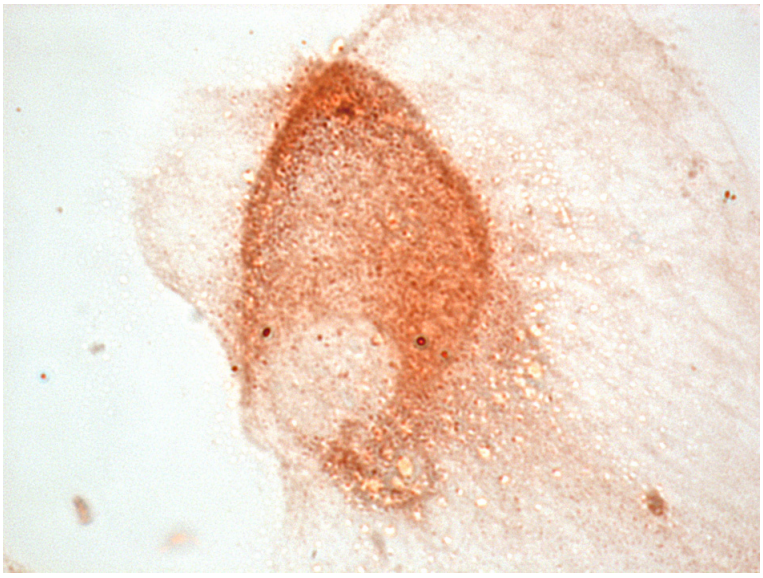


Bild 4.61: Auch an dieser Zelle sind die Kv1.3-Untereinheiten deutlich als körnige Strukturen zu erkennen, die auf den gesamten Zellleib verteilt sind. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P2, ohne Beschichtung

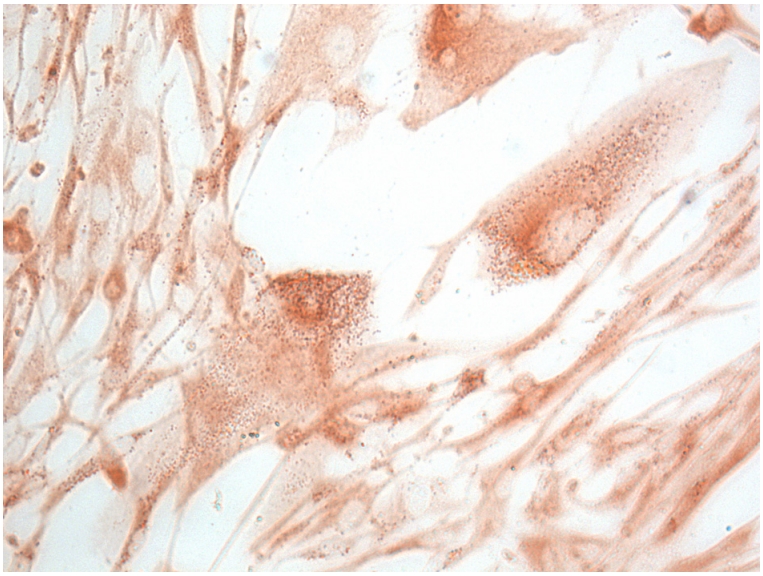


Bild 4.62: Im Bild sind lang gestreckte und teilweise stark vergrößerte Zellen zu sehen. Die Struktur der Färbung ist von der Zellform unabhängig. Im Vergleich zu den vorherigen Bildern sind die Bereiche der Zellkerne im Färbebild weniger ausgespart. Vergr.: 200x

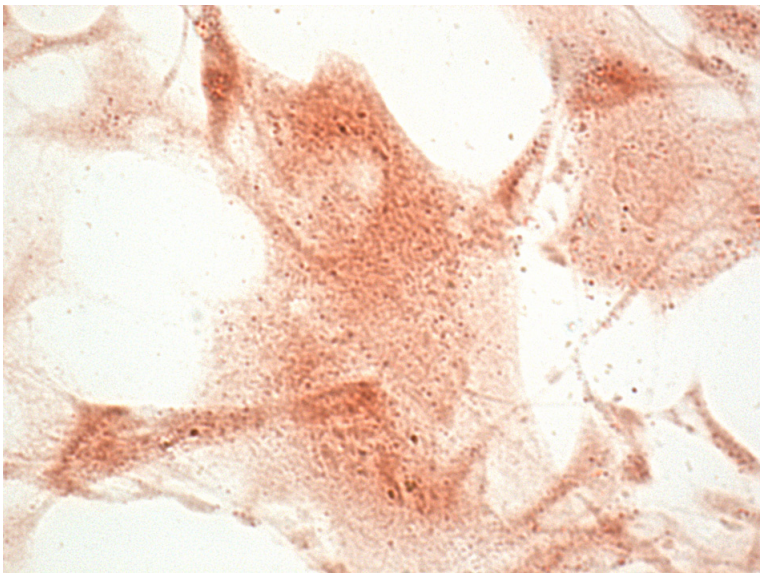


Bild 4.63: Die große RPE-Zelle im Bildzentrum wird teilweise von Ausläufern anderer Zellen überwachsen. Die Kv1.3-Untereinheiten sind als körnige Strukturen deutlich erkennbar und scheinen die Zellkerne zu überdecken. Vergr.: 400x

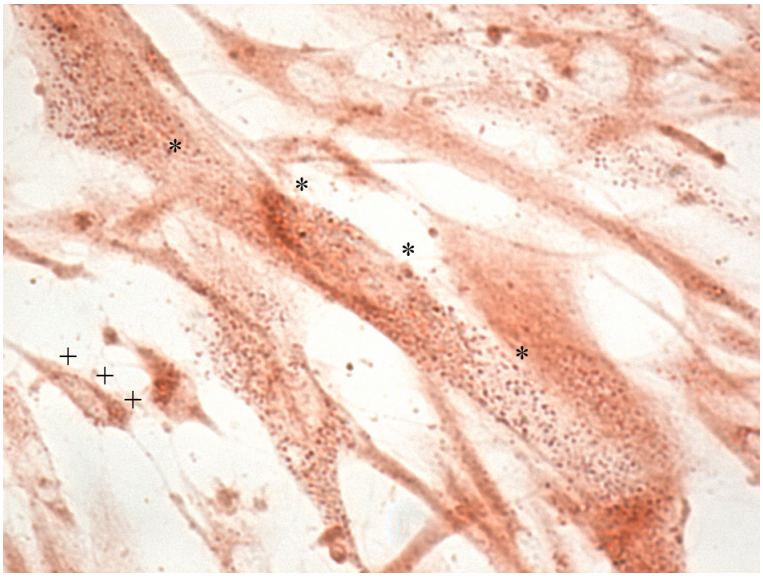


Bild 4.64: Die große fibroblastoide RPE-Zelle (Stern) weist genauso wie eine sehr viel kleinere elongierte Zelle (Plus) Kv1.3-Kanäle auf. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P3, ohne Beschichtung

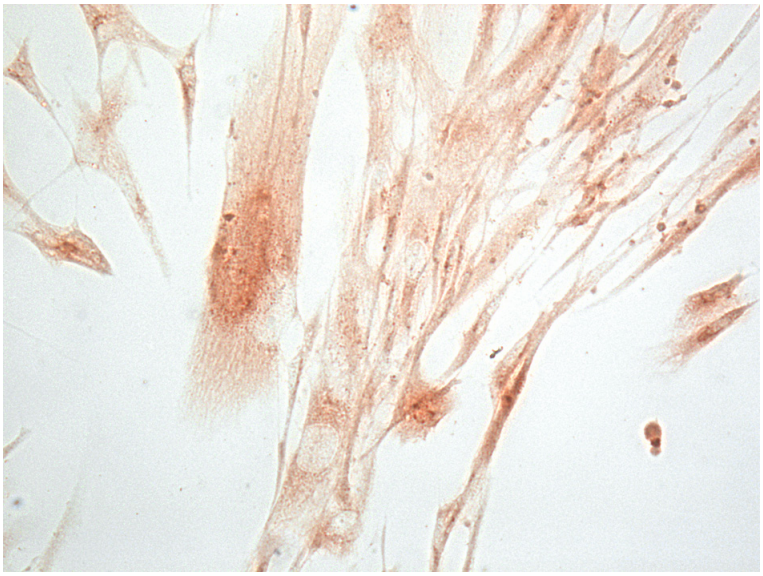


Bild 4.65: Nach der dritten Passage ist im Wachstumstyp und in der Art der Färbung kein Unterschied zur vorherigen Kultur erkennbar. Vergr. 200x

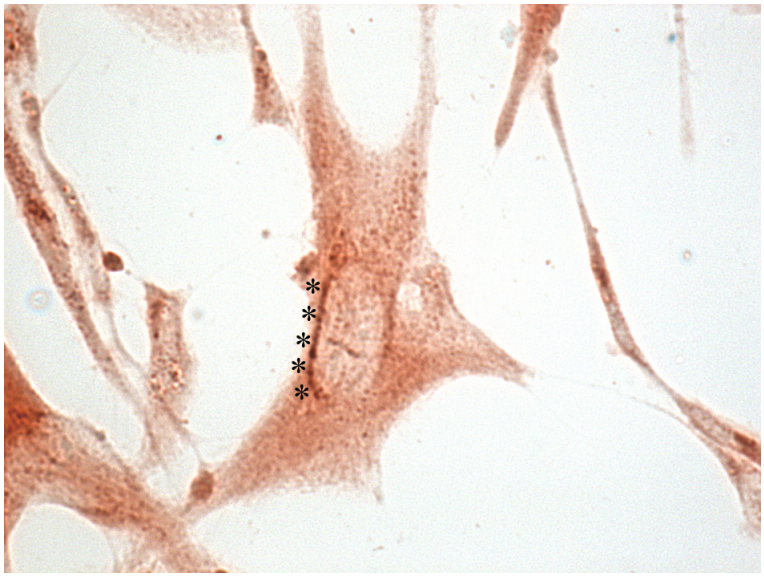


Bild 4.66: In unmittelbarer Nähe des Zellkerns verläuft ein intensiv gefärbter Streifen, bestehend aus einer dichten Kette von Kv1.3 Kanälen. Vergr.: 400x

RPE-Zellkultur P4, ohne Beschichtung

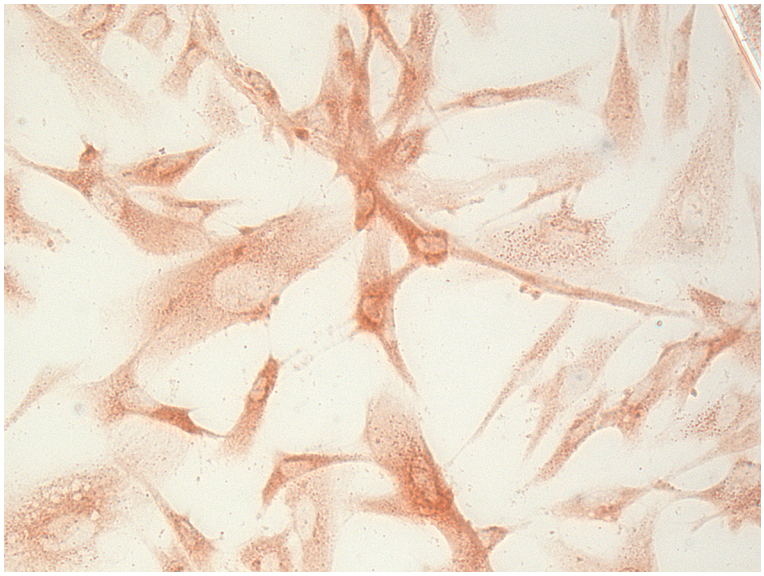


Bild 4.67: Die P4-Kultur zeigt keine Veränderungen im Wachstumstyp. Der Charakter der Färbung bleibt konstant. Vergr.: 200x

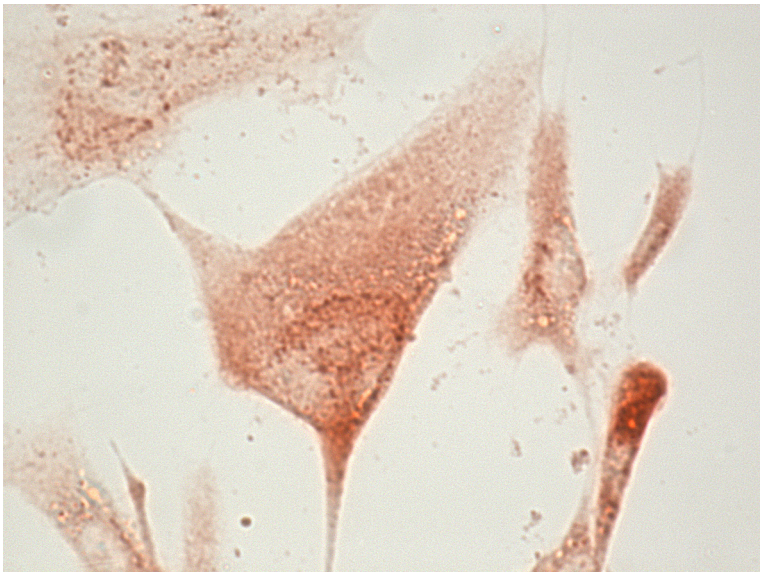


Bild 4.68: Auch in diesem Bild ist die typische Anhäufung von Kv1.3-Kanälen in Kernnähe mit begleitender intensiver Färbung über dem Zellkern zu sehen. Vergr.: 400x

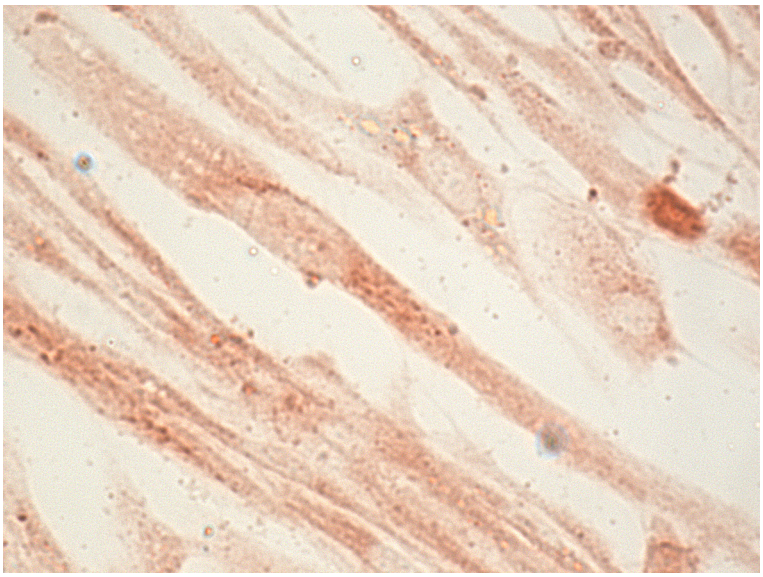


Bild 4.69: Das Bild zeigt parallel angeordnete, lang gestreckte Zellen, die scheinbar morphologisch dedifferenziert sind. Jedoch sind auch hier Kv1.3-Untereinheiten in typischer Verteilung nachweisbar. Vergr.: 400x

4.4 Färberische Darstellung von Kv1.3-Untereinheiten in Kryoschnitten von serumfrei kultivierten RPE-Monolayern

Die auf Transwell®-Membranen gezüchteten RPE-Monolayer wiesen aufgrund der besonderen Kultivierungsmethode (Verwendung von serumfreien Medium und Mediumsupplementen bFGF, EGF und Fibronektin) einen sehr hohen Gehalt an Pigmentgranula auf. Um eine sichere Unterscheidung zwischen angefärbten Strukturen und Pigmenten zu gewährleisten, kam ein RhodaminRed™ -markierter Sekundärantikörper zur Anwendung. Dieses modifizierte Färbeprotokoll ergab eine spezifische Färbung von Kv1.3-Kaliumkanälen im Bereich der basalen Zellmembran der kultivierten RPE-Zellen. Neben der leichten Hintergrundfärbung zeigt sich eine intensive Färbelinie entlang der basalen RPE-Zellgrenzen. Die apicalen Zellmembranen sind ohne spezifische Färbung. In der Negativkontrolle ist eine Grenze zwischen RPE-Monolayer und Trägermembran zu erkennen, jedoch ohne die oben beschriebene Färbelinie.

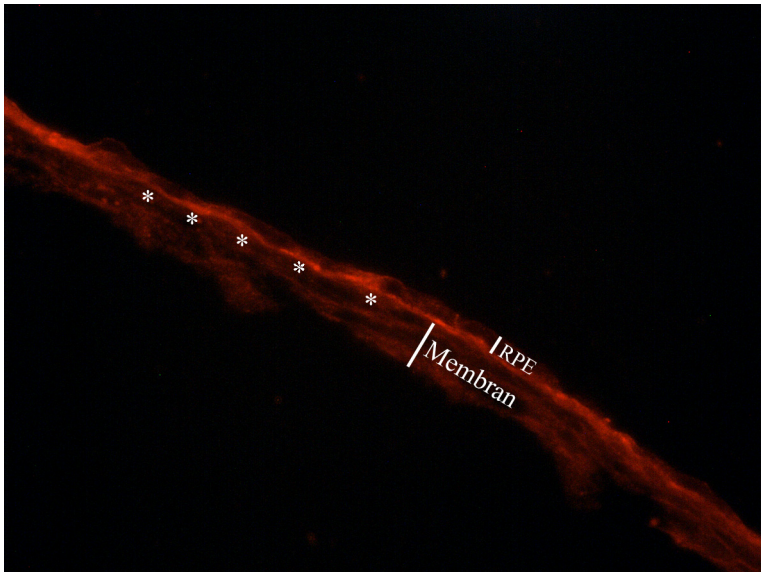


Bild 4.70: Die auf der Kollagenmembran kultivierten RPE-Zellen weisen eine abgeflachte Form auf. An der basalen Zellmembran sind die gefärbten Kv1.3-Kaliumkanäle als eine fluoreszente Linie erkennbar (Sterne). Vergr.: 200x

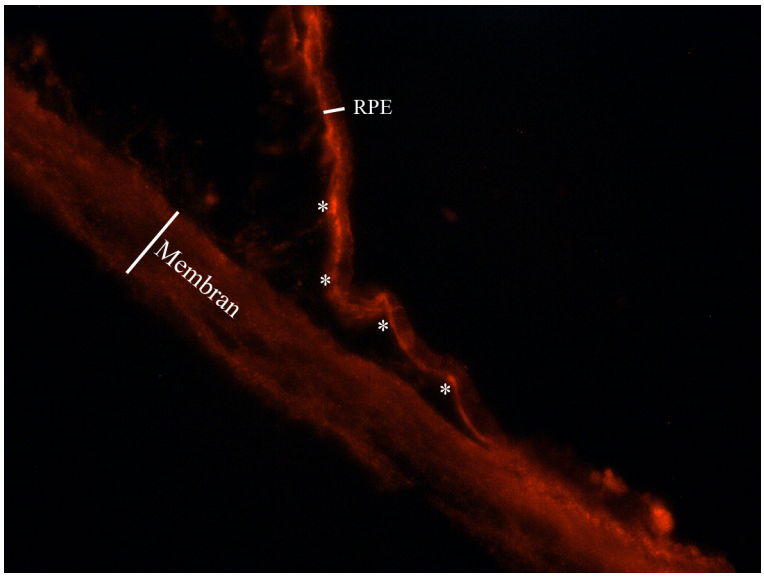


Bild 4.71: In diesem Bildabschnitt ist die RPE-Zellschicht von der Matrix abgelöst. Die Fluoreszenzlinie ist der RPE-Zellschicht assoziiert (Sterne). Vegr.: 200x

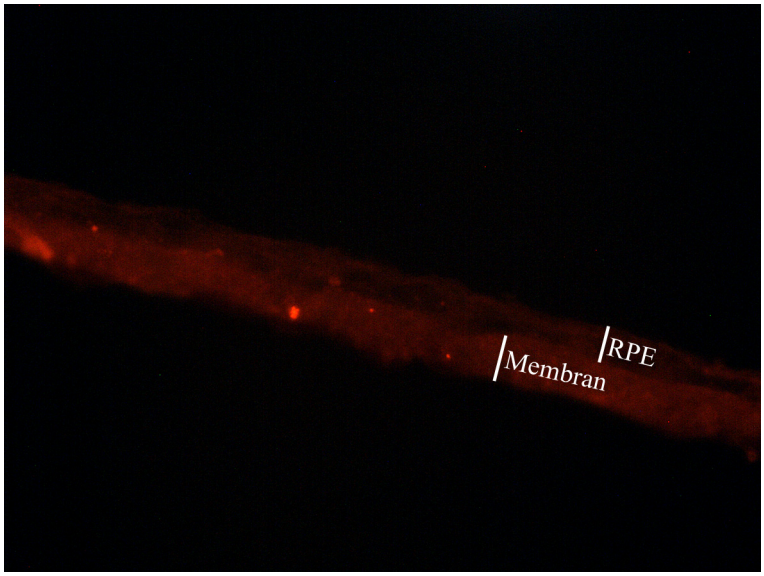


Bild 4.72: Die Negativkontrolle stellt sich ohne Fluoreszenzlinie dar. Vergr.: 400x

5 Diskussion

5.1 Betrachtung von Material und Methode

5.1.1 Nachweis von Kv1.3-Kaliumkanälen in Mäusehirnschnitten

Zur Etablierung des Färbeprotokolls wurden kryokonservierte histologische Schnitte von Mäusehirnen verwendet, da in encephalem Nervengewebe Zellen mit Kaliumkanälen vom Kv1.3-Typ bereits nachgewiesen wurden (Coetzee, Amarillo et al. 1999; Chung, Shin et al. 2000; Chung, Shin et al. 2001).

Der Versuch des Nachweises mit Hilfe der LSAB-Methode gelang nicht; eine starke Hintergrundfärbung verhinderte eine Beurteilung der Färbung. Das Auftreten dieser unspezifischen Reaktion in der Negativkontrolle legt die Vermutung nahe, dass eine endogene alkalische Phosphataseaktivität die unspezifische Färbung verursacht hat. Der Einsatz eines FITC-markierten Sekundärantikörpers sollte diese Problematik umgehenführte aber dazu, dass keine Kv1.3-Kanäle nachgewiesen werden konnten. Dies könnte aus einer zu geringen Signalverstärkung dieser Methode oder einem vorzeitigen Verlust der Fluoreszenz (bleaching) resultieren. Die Anwendung eines HRP-konjugierten Sekundärantikörpers (indirekte zwei-Schritt-Methode) in Verbindung mit AEC als Chromogen erbrachte ein spezifisches Färbergebnis, welches als Positivkontrolle für alle weiteren Färbeversuche herangezogen wurde. Um eine unspezifische Färbung durch endogene Peroxidasen zu verhindern, wurden die Gefrierschnitte mit einem Peroxidasen-Blockierreagenz vor dem Aufbringen des Primärantikörpers inkubiert. In vergleichenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass die enthaltenen Substanzen Wasserstoffperoxid und Natriumazid eine effektive Unterdrückung endogener Peroxidasen bei gleichzeitiger Schonung der Antigenität und

von morphologischen Details bewirken (Li, Ziesmer et al. 1987). Somit konnte der Nachweis von Kv1.3-Kanälen an Hirngewebe erfolgreich erbracht werden.

5.1.2 In Situ-Nachweis von Kv1.3-Kanälen in Paraffinschnitten des humanen hinteren Augenabschnitts

Formaldehyd fixiert durch die Bildung von quervernetzenden Hydroxymethylenbrücken, wodurch es zu einer Epitopmaskierung kommen kann (Boenisch, Henne et al. 2003). Die Erweiterung des Färbeprotokolls durch eine Vorbehandlung der Schnitte mit Proteinase K® bewirkt eine proteolytische Andauung, wodurch es zu einer Erhöhung der Permeabilität und einer möglichen Demaskierung des Epitops kommt. Neben der spezifischen Färbung von Kv1.3-Untereinheiten in der basalen Zellmembran der RPE-Zellen lag eine unspezifische Hintergrundfärbung vor. Sie ist relativ gleichmäßig verteilt im Bereich der Choroidea und Sklera, in der Schicht der Stäbchen und Zapfen mit ihren Außensegmenten ist eine fleckenartige Färbung erkennbar. Aufgrund der Zerstörung großer Bereiche des stratum nervosum der Retina im Präparat ist eine strukturelle Zuordnung dieser gefärbten Bereiche kaum möglich. Dementsprechend wäre eine Einordnung in die Kategorien spezifische oder unspezifische Färbung dieser Gebiete spekulativ. Der Nachweis von mRNA für Kv1.3-Untereinheiten in murinen RPE-Zellen (Pinto and Klumpp 1998) korrespondiert mit der immunhistochemischen Darstellung von Kv1.3-Kanälen an RPE-Zellen in vorliegender Arbeit.

Die Färbungen in der Choroidea und der Sklera sind jedoch relativ sicher als unspezifisch einzuordnen. Eine endogene Peroxidaseaktivität kann als Ursache ausgeschlossen werden, da zum einen eine Präinkubation mit H2O2 duchgeführt wurde und zum anderen die Negativkontrollen ohne jegliche Färbung sind. Deutlich abgegrenzt und deshalb als spezifisch einzuordnen ist die Färbelinie im basalen Bereich der RPE-Zellschicht.

5.1.3 Nachweis von Kv1.3-Kanälen in kultivierten RPE-Zellen

Die auf Chamberslides kultivierten RPE-Zellen wurden nach Paraformaldehyd-Fixierung mit dem etablierten Protokoll gefärbt. Es gelang jedoch keine Darstellung der Kv1.3 Kanäle an den unversehrten Zellen. Durch die daraufhin modifizierte Fixierung mit Ethanol / Glycin, wurden die Zellmembranen permeabel, so dass der Primärantikörper ungehindert an das intrazellulär gelegene Epitop des membranständigen Kanalproteins binden konnte. Somit wurden die vorherigen Ergebnisse ebenfalls an den Zellkulturen bestätigt. Diese Methode schließt theoretisch die Färbung von zytoplasmatisch gelegenen Vorstufen des Kv1.3-Kanals ein.

5.1.4 Darstellung von Kv1.3-Kanälen in Kryoschnitten von kultivierten RPE-Zell-Monolayern

Die Kultivierung von RPE-Zellen auf Kollagenmembranen ermöglicht die Anfertigung von Schnittpräparaten, so dass die Lokalisierung der Kv1.3-Kanäle in der basalen oder apicalen Membran beurteilt werden konnte. Die mit serumfreiem Medium kultivierten RPE-Zellen haben ihre Pigmentierung weitestgehend behalten. Durch die Verwendung eines fluoreszierenden Sekundärantikörpers sind die angefärbten Strukturen deutlich von den Pigmentgranula abgrenzbar. Demzufolge kann eine verdeckte apicale Färbung von Kv1.3-Untereinheiten ausgeschlossen werden. Aufgrund der Negativkontrolle kann ausgeschlossen werden, dass durch eine Eigenfluoreszenz der RPE-Zellen ein falsch positives Färbergebnis vorliegt.

5.2 Einfluß der Kultivierungsmethode auf die Expression von Kv1.3-Untereinheiten in RPE-Zellen

5.2.1 Allgemeiner Einfluss der Kultivierung auf RPE-Zellen

Die Umsetzung von RPE-Zellen aus ihrer natürlichen in eine künstliche Umgebung zur weiteren Kultivierung bewirkt zahlreiche Veränderungen in Morphologie und Funktion der Zellen. Die Art der Veränderungen ist stark von den Bedingungen der Kultivierung abhängig, was in Anbetracht des hohen Spezialisierungsgrades dieses Gewebes zu erwarten ist. Diese Deadaptation ist nicht mit Dedifferenzierungs- und Transdifferenzierungsprozessen zu verwechseln (Engelmann and Valtink 2004).

Nahezu sofortige Umstellungen finden zum Beispiel im Phänotyp der Zellen statt. Es erfolgt bereits nach kurzer Zeit in Primärkultur eine Umgestaltung von einer kubischen, epitheloiden in eine lang gestreckte, fibroblastische Zellform. Weiterhin verlieren die Zellen den größten Teil ihrer Pigmentierung (Valtink, Engelmann et al. 1999). Funktionelle Veränderungen wurden im Transport von Ionen durch veränderte Exprimierung von Ionenkanälen (Strauss and Wienrich 1994) oder in Umstellungen in der Phagozytoseaktivität (Karl, Valtink et al. 2006) festgestellt.

Viele Bemühungen zielen darauf ab, die Bedingungen für die Kultivierung derart zu optimieren, dass die Zellen möglichst wenig dedifferenzieren (Sobottka Ventura, Böhnke et al. 1996; Valtink, Engelmann et al. 1999; Hu and Bok 2001). Verbesserungen diesbezüglich ergaben sich aus der Verwendung spezieller Basalmedien angepasst an die besonderen Bedürfnisse von RPE-Kulturen, der Einsatz von Wachstumfaktoren (z.B. durch die Zugabe von Serum) oder die Verwendung von zell- oder gewebekonditionierten Medien (Valtink, Engelmann et al. 1999; Engelmann and Valtink 2004; Karl, Valtink et al. 2006). RPE-Kulturen, die mit dem von Sobottka Ventura et al. (Sobottka Ventura, Böhnke et al. 1996) entwickelten Medium F99RPE

gezüchtet worden sind, zeigten den Erhalt der Exprimierung von L-Typ-Calciumkanälen sowie von MHC-Antigenen. Dies sind wichtige Marker zum Nachweis der Aufrechterhaltung der Differenzierung von RPE-Zellen in vitro (Valtink, Engelmann et al. 1999).

Bezüglich der Zellmorphologie und der Pigmentierung wurden die Erfahrungen, die bisher mit dem Medium F99RPE gemacht wurden, in dieser Arbeit bestätigt, wobei zu erwähnen ist, dass das hier verwendete Medium im Gegensatz zur Originalrezeptur kein Choroidea-konditioniertes Medium enthielt. Die Zellen behalten ihre epitheloide Morphologie und die Pigmentierung maximal bis zur Primärkultur P0. In allen weiteren Passagen sind die Zellleiber lang gestreckt und besitzen zahlreiche Fortsätze. Einige Zellen stellen ihre Zellteilung ein und vergrößern ihre Fläche; oft sind diese Zellen mehrkernig. Derartige Riesenzellen nehmen nicht mehr am Zellzyklus teil und sind deshalb nicht weiter kultivierbar. Die Mehrheit der Zellen verliert ihre Pigmentgranula nach der ersten Passagierung. Bei diesen Veränderungen stellt sich die Frage, ob es sich um Dedifferenzierungen oder Transdifferenzierungen handelt und ob sie mit funktionellen Änderungen einhergehen. Untersuchungen, bei denen die RPE-Kultivierung mit F99RPE durchgeführt wurde, konnten zeigen, dass zwar typische RPE-Merkmale wie epitheloide Zellform und Pigmentierung verloren gehen, funktionelle Charakteristika wie z.B. die Ausbildung von L-Typ Calciumkanälen dagegen erhalten bleiben (s.o.). Bei der Verwendung von konventionellen Medien-hingegen gingen neben dem morphologischen Phänotyp ebenfalls funktionelle Merkmale verloren (Pfeffer 1991; Strauss and Wienrich 1994; Hu and Bok 2001). Der Verlust typischer morphologischer Kennzeichen von RPE-Zellen in Kultur muss dementsprechend nicht zwangsläufig Ausdruck einer Dedifferenzierung sein. Einen wichtigen Faktor bei der Ausbildung des Phänotyps von epithelialen Zellen stellt die Interaktion mit Komponenten der Basallamina dar (Schock and Perrimon 2002). Es

wurde nachgewiesen, dass der mRNA-Phänotyp von nativen makulären RPE Zellen sich von dem kultivierter RPE-Zellen unterscheidet. Darüber hinaus ergaben sich ebenfalls Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kulturgefäßbeschichtungen. RPE wurde ohne Beschichtung respektive auf Kunststoff, auf Kollagen Typ I und IV, auf Laminin, auf Matrigel und auf Fibronektin kultiviert. Die auf Kunststoff gezüchteten Zellen wiesen die größte Übereinstimmung mit der Exprimierung von nativen RPE-Zellen auf (Tian, Ishibashi et al. 2004). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substrate (Kunststoff, Gelatine, Fibronektin) hatten unterschiedliche Einflüsse auf die Morphologie der RPE-Kulturen. Die RPE-Zellen, die auf Gelatine und Kunststoff gezüchtet wurden, behielten in der Primärkultur länger sowohl ihren epithelialen Charakter als auch ihre Pigmentierung, während diese Merkmale beim Fibronektin nahezu sofort verloren gingen. Die Bilder von der Primärkultur auf Gelatinesubstrat zeigen viele Zellen, die noch ausgeprägte Merkmale von RPE-Zellen in situ besitzen. Dies könnte durch eine erleichterte Anheftung der Zellen nach der Aussaat bedingt sein. Da Fibronektin chemotaktisch und proliferativ auf RPE-Zellen wirkt (Priglinger, Alge et al. 2004), war der schnellere Verlust der epitheloiden Morpholgie in Kultur zu erwarten. Weiterhin zeigten die Zellen der Primärkultur mit Fibronektinbeschichtung eine geringere Apoptoserate. Dennoch scheint insgesamt der Einfluss des Kulturmediums auf die Morphologie von RPE-Zellen in vitro von größerer Bedeutung zu sein, zumal die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix mit zunehmender Kulturdauer von den Zellen selbst beeinflusst wird.

5.2.2 Exprimierung von Kv1.3-Kanälen während der Kultivierung

Eine wesentliche Funktion des RPE besteht in dem Transport von Ionen und Wasser von apical aus dem subretinalen Raum nach basolateral in die Choriokapillaris (Strauss 2005). Dies wird durch spezifische Transportmechanismen über Ionenkanäle des RPE gewährleistet (Strauss 2005). Dementsprechend kann die Exprimierung von

Ionenkanälen, die ebenfalls von RPE-Zellen in vivo ausgebildet werden, als ein signifikantes Charakteristikum für den Differenzierungsgrad von kultivierten RPE-Zellen angesehen werden (Valtink, Engelmann et al. 1999). In vorherigen Untersuchungen wurden L-Typ-Calciumkanäle, zusammengesetzt aus Cav1.3-Untereinheiten (neuroendokriner Subtyp), an frisch isolierten und kultivierten RPE-Zellen von verschiedenen Spezies, einschließlich des Menschen, nachgewiesen (Ueda and Steinberg 1993; Strauss, Mergler et al. 1997; Valtink, Engelmann et al. 1999; Strauss, Buss et al. 2000; Rosenthal and Strauss 2002). Die Regulation der Ca2+-Homöostase in RPE-Zellen durch L-Typ-Calciumkanäle steht in engem funktionellen Zusammenhang mit der Aktivität von spannungsabhängigen K+-Kanälen, bestehend aus Kv1.3 Untereinheiten. Diese auswärts rektifizierenden Kv1.3-Kanäle werden bei gleichen Membranpotentialen wie L-Typ-Calciumkanäle aktiviert. Dadurch erfolgen eine Stabilisierung des Ruhepotentials und eine daraus resultierende Limitierung der Reaktion der Calciumkanäle. Weiterhin werden beide Kanäle durch cytosolische Tyrosinkinase vom src-Typ aktiviert, wobei die Kv1.3-Kanäle verzögert reagieren. Hierdurch wird eine Überladung der RPE-Zelle mit Ca2+-Ionen verhindert, denn die Aktivität der L-Typ Calciumkanäle ist durch den verspäteten K+-Austrom wegen der damit verbundenen Hyperpolarisation eingeschränkt (Strauss 2005).

Wollmann et al. gelang ein immunhistochemischer Nachweis von Kv1.3-Kanälen an murinen RPE-Primärkulturen (Wollmann, Lenzner et al. 2006). In der hier vorgelegten Arbeit wird gezeigt, dass Kaliumkanäle bestehend aus Kv1.3-Untereinheiten in humanen RPE-Zellen in vivo und in vitro immunhistochemisch nachweisbar sind. Darüber hinaus kann belegt werden, dass mit F99RPE kultivierte RPE-Zellen bis in die vierte Subkultur Kv1.3-Untereinheiten exprimieren. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Substraten. Diese Ergebnisse geben jedoch keine Auskünfte über die Funktion der dargestellten Kaliumkanäle.

Mehrfach konnte bereits gezeigt werden, dass sich unterschiedliche α-Untereinheiten zu einem funktionierenden Kanal zusammenfügen können (Christie, North et al. 1990; Shahidullah, Hoshi et al. 1995; Hugnot, Salinas et al. 1996). Diese heteromultimeren Kanäle unterscheiden sich in ihrer Funktionen wesentlich gegenüber jenen, die aus jeweils vier gleichen α-Untereinheiten aufgebaut sind. Es wäre also theoretisch möglich, dass sich im Laufe der RPE-Kultivierung die Zusammensetzung der Kaliumkanäle verändert und damit unter Umständen ebenfalls der gesamte Ionentransport über die RPE-Zelle. Dies brächte jedoch eine verringerte Exprimierung und damit eine schwächere immunhistochemische Färbung mit sich. Dies würde ebenfalls geschehen, wenn monomere Kv1.3-Kanäle in geringerer Anzahl produziert werden. Da zahlreiche Faktoren die Färbeintensität von immunhistochemischen Färbungen beeinflussen, ist ein Rückschluss auf die Quantität von Kv1.3-Kanälen jedoch kaum zulässig. Die Funktion von spannungsabhängigen Ionenkanälen ist ferner durch Bindung weiterer Proteine an die Kanalproteine modulierbar. Dementsprechend wäre es möglich, dass kultivierte RPE-Zellen Kv1.3-Kanäle exprimieren und daraus eine Immunoreaktivität resultiert, während sich die Kanalfunktionen verändern. Dies kann beispielsweise durch ß-Untereinheiten (Pongs, Leicher et al. 1999), durch KChaP (Kaliumkanal aktivierendes Protein) (Wible, Yang et al. 1998) oder Tyrosinkinasen (Cook and Fadool 2002; Strauss, Rosenthal et al. 2002) erfolgen. Etwaige Funktionsmodulationen sind über die Ergebnisse dieser Arbeit nicht beurteilbar bzw. nachweisbar. Weitere hilfreiche Aufschlüsse diesbezüglich würden Untersuchungen mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik erbringen. Lässt man funktionelle Aspekte außer Acht, ist die in dieser Untersuchung dargestellte Exprimierung von Kv1.3-Untereinheiten durch RPE-Zellen bis in die vierte Subkultur ein deutlicher Hinweis für den Erhalt ihrer Differenzierung.

5.3 Lokalisation von Kv1.3-Kanälen in RPE Zellen

In seiner Funktion als Ionen (selektiv) transportierendes Epithel weist das RPE eine starke strukturelle Polarisierung auf. Der Transport von Ionen zwischen subretinalem Raum und Choriokapilaris findet ausschließlich über das Zellinnere statt. Dieser Funktion entsprechend ist die Distribution von Zellorganellen und Membranproteinen ausgerichtet. Die Leitfähigkeit für Kaliumionen ist an der basolateralen Membran größer als an der apicalen, so dass ein Netto-K+-Transport vom subretinalen Raum zur Choriokapilaris resultiert. An der apicalen Membran wird die K+-Leitfähigkeit durch Kir 7.1 (einwärts rektifizierende) Kaliumkanäle, Na+/K+-ATPase und den Na+-K+-2Cl--Cotransporter gewährleistet. Der Transport über die basolaterale Membran ist weitgehend unklar. Mögliche Kanäle wären ein Ca2+-abhängiger Kaliumkanal und ein M-Typ Kaliumkanal, beide mit der Eigenschaft ausgestattet, eine hohe K+-Leitfähigkeit über einen großen Potentialbereich zu besitzen (Strauss 2005). Da Kv1.3-Kanäle im Bereich des Membranruhepotentials von RPE-Zellen nicht aktiv sind, ist es unwahrscheinlich, dass sie an dem Netto-Kaliumtransport über das RPE wesentlich beteiligt sind. Sie besitzen eine eher regulative Funktion, beispielsweise bei der Ca2+-Homöstase (s.o.)(Hughes and Steinberg 1990; Strauss, Richard et al. 1993; Tao, Rafuse et al. 1994; Hughes, Takahira et al. 1995; Takahira and Hughes 1997; Strauss, Rosenthal et al. 2002). Es wird angenommen, dass diese Prozesse an der basolateralen Membran stattfinden, vergl. (Strauss 2005). In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass eine Immunoreaktivität für Kv1.3-Untereinheiten an der basolateralen Membran von RPE Zellen in vivo und in vitro vorliegt. Dies steht in gewissem Widerspruch zu den Ergebnissen von Pinto et al., die Immunoreaktivität auf Kv1.3-Kanäle im Bereich der Stäbchenaußensegmente muriner Retina entdeckten. Es konnte jedoch keine entsprechende mRNA in den Photorezeptoren isoliert werden. Da

die Autoren jedoch mRNA für Kv1.3-Untereiten in RPE Zellen nachweisen konnten, vermuteten sie, dass die Immunoreaktivität in den apicalen Ausläufern der RPE-Zellen läge, was sie jedoch nicht belegen konnten (Pinto and Klumpp 1998). Höltje et al. konnten Kv1.3-Kanäle in allen Teilen (äußere/innere Segmente und Zellkörper) der Zapfenzellen immunhistochemisch nachweisen. Hierdurch werden einerseits die Ergebnisse von Pinto et al., nämlich eine Anfärbung der den subretinalen Spalt limitierenden Strukturen erklärbar, sowie deren Vermutung, die Kanäle seien an den Mikrovilli der RPE-Zellen lokalisiert, widerlegt (Höltje 2007). Durch den hohen Pigmentgehalt der apicalen Zellbereiche können die immunhistochemischen Färbungen an den humanen Augenschnitten in dieser Arbeit keinen Aufschluss über die Distribution von Kv1.3-Knälen am apicalen Zellpol geben. Die kultivierten RPE-Zellen weisen jedoch im Schnittbild keine Immunoreaktivität an der apicalen Zellmembran auf. Auswärts rektifizierende K+-Ströme über Kv1.3-Kanäle sind in vivo hinsichtlich des theoretischen Bedarfs an K+-Ionenfluss in diesem Funktionsbereich nicht zu erwarten. Der Austausch von K+-Ionen zwischen subretinalem Spalt und RPE-Zelle erfolgt durch die Na+/K+-Pumpe, den Na+/K+/2 Cl--Cotransporter und durch den Kir 7.1 K+-Kanal. Dieser gewährleistet den Hauptteil des K+-Durchflusses an der apicalen Zellmembran: Zum einen steigert der aktivierte einwärts rektifizierende Kanal die Effektivität der Na+/K+-Pumpe und zum anderen wird die subretinale K+-Konzentration reguliert (Strauss 2005). Die für vorgelegte Arbeit auf permeablen Membranen gezüchteten RPE-Zellen exprimieren Kv1.3-Untereinheiten ausschließlich an der basalen Zellmembran. Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass in vivo K+-Ströme über Kv1.3-Kanäle an der basalen RPE-Zellmembran stattfinden. Die in Aufsichtsaufnahmen dokumentierten Färbergebnisse der auf unterschiedlichen Substraten kultivierten RPE-Zellen lassen nur sehr eingeschränkt Rückschlüsse auf die Lage der Kv1.3-Untereinheiten innerhalb der Zelle zu. Die folgenden schematischen Zeichnungen sind eine hypothetische Interpretationshilfe zu diesen Ergebnissen.

Die RPE-Zellen sind jeweils in einer Aufsicht und im Querschnitt dargestellt. Die Form der Zelle entspricht der vorwiegend vorgefundenen Morphologie der kultivierten RPE-Zellen.

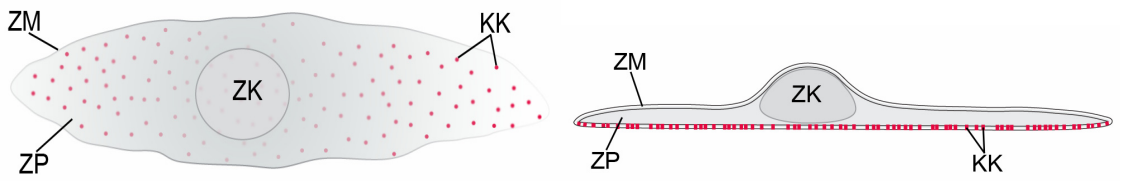


Abb. 5.1: Hypothetische Ansicht einer gefärbten Zelle unter der Annahme, dass die Kaliumkanäle in der basalen Zellmembran gleichmäßig verteilt, lokalisiert sind und keine zytoplasmatisch gelegene Immunoreaktivität vorliegt. Die Kanäle wären in der Zellperipherie am deutlichsten erkennbar, da hier das Zytoplasma die geringste Schichtstärke hat. Zum Zellkern hin nimmt diese zu, so dass die Kanäle in geringerem Maße durchscheinen würden. Im Bereich des Zellkerns wären die Kv1.3-Untereinheiten nur noch sehr schwach erkennbar. ZM: Zellmembran; ZP: Zytoplasma; ZK: Zellkern; KK: Kv1.3-Kaliumkanäle

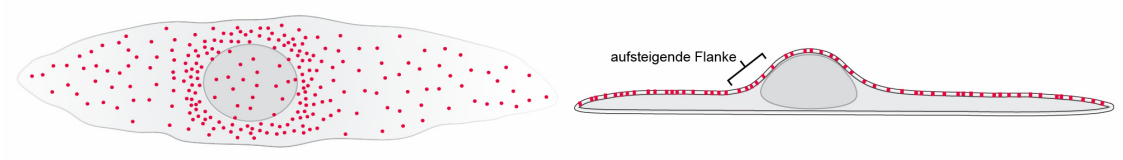


Abb. 5.2: Geht man davon aus, dass sich ausschließlich in der apicalen Zellmembran Kv1.3-Kaliumkanäle befinden, ergäbe sich in der Aufsicht dieses Bild. Die angefärbten Kanäle wären relativ deutlich und scharf zu erkennen. Die Färbung würde sich auch über den Bereich des Zellkerns erstrecken. Im Bereich der aufsteigenden Flanke der apicalen Zellmembran zirkulär um den Zellkern würde in der Aufsicht ein optischer Summationseffekt dazu führen, dass der Eindruck einer Anhäufung von Kanälen entsteht.

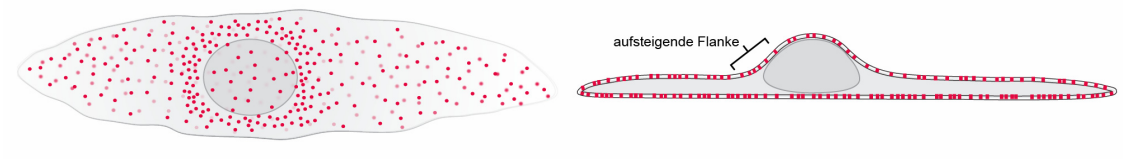


Abb. 5.3: Diese Ansicht ergibt sich aus der Annahme, dass die gefärbten Kanäle in der basalen und apicalen Zellmembran gleichmäßig verteilt vorkommen. Die Kanäle der apicalen Membran wären deutlich und relativ scharf abgebildet, während die der basalen Membran etwas undeutlicher erkennbar wären. In der Summe wäre die

Färbeintensität gegenüber den beiden vorherigen Modellen deutlich erhöht. Theoretisch müssten auch Kanäle im Bereich über dem Zellkern klar zu sehen sein. Der Eindruck einer Anhäufung von Kanälen um den Zellkern würde auch in diesem Fall auftreten.

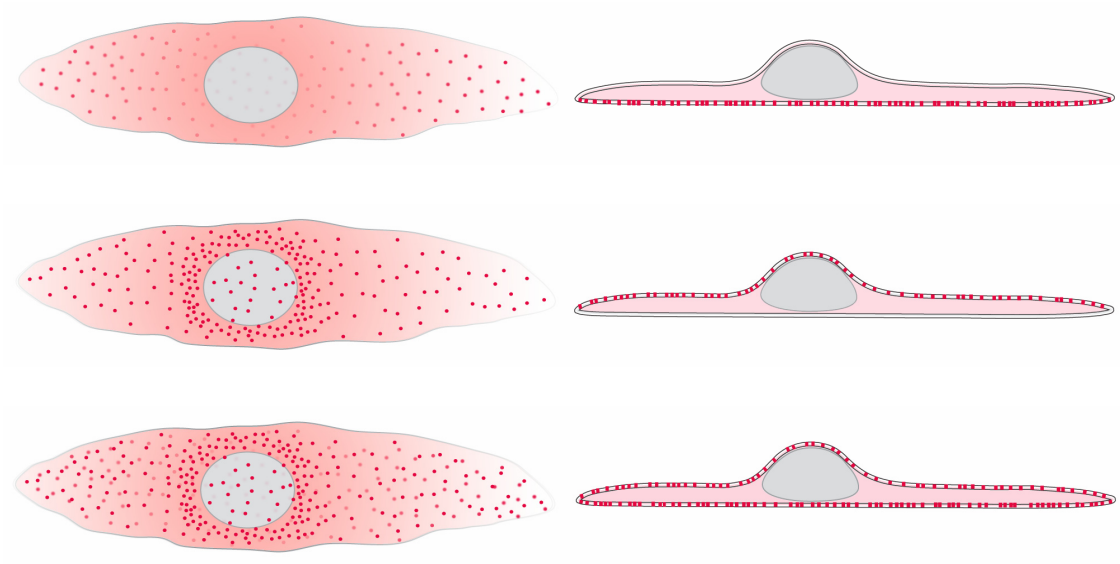


Abb. 5.4: Dargestellt sind alle drei Versionen jeweils mit angefärbtem Zytoplasma. Der Bereich des Zellkerns erscheint noch stärker ausgespart. Die Intensität der rötlichen Färbung nimmt vom Bereich zirkulär um den Zellkern zur Zellperipherie hin ab. Dies erklärt sich durch eine höhere Schichtdicke des Zytoplasmas in der direkten Umgebung des Zellkerns und eine Abnahme der Schichtstärke in der Zellperipherie.

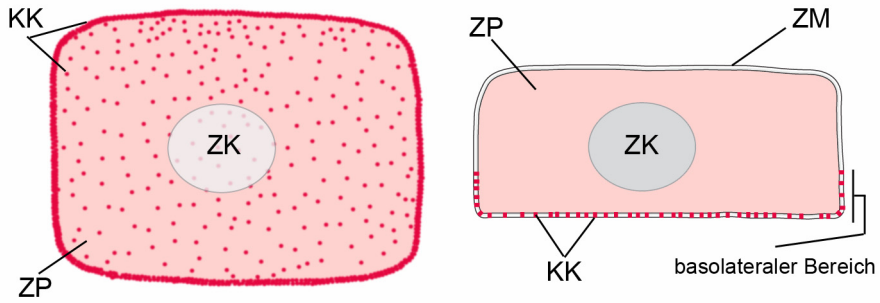


Abb. 5.5: Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung einer RPE-Zelle in der Aufsicht und im Querschnitt, die noch annähernd die typische isoprismatische Morphologie besitzt. Es wird eine gleichmäßige Verteilung angefärbter Kaliumkanäle in der basalen und baso-lateralen Membran angenommen. Durch einen Summationseffekt der Kv1.3-Kanäle im Bereich der baso-lateralen Membran entstünde in der Aufsicht der Eindruck einer Anhäufung dieser Kanäle in der Zellmembran (rötliche Umrandung). Da über dem Zellkern keine Kanäle in der Membran liegen, würde der Bereich des Zellkerns als ausgespart erscheinen. Die in der darunter

liegenden Zellmembran lokalisierten Kaliumkanäle würden zart durch den Kern durchscheinen. Durch das Zytoplasma wären die angefärbten Kanäle relativ unscharf bzw. undeutlich erkennbar.

Da kultivierte RPE-Zellen nicht mehr in Beziehung zu ihren normalerweise sie umgebenden Geweben stehen, sondern in einem artifiziellen und an Faktoren deutlich reduzierten Milieu wachsen, ist eine Veränderung der Polarisierung ihrer Zellorganellen denkbar. Legt man die in den Abbildungen dargestellte Hypothese zugrunde, sind Kv1.3-Kanäle in den basalen und apicalen Membranen der kultivierten RPE-Zellen lokalisiert. Begleitend scheint eine zytoplasmatisch gelegene Immunoreaktivität vorzuliegen. Die RPE-Zellen, die direkt auf dem Kunststoff der Kulturgefäße gezüchtet wurden, fallen dadurch auf, dass sie über dem Zellkern intensiver gefärbt sind als die Zellen der anderen Kulturen mit Substratbeschichtungen. Dies könnte ein Hinweis sein, dass eine überwiegende Distribution der Kv1.3-Kanäle in der apicalen Membran dieser RPE-Zellen stattfindet. Die auf Membranen kultivierten RPE-Zellen sind von oben und unten mit Medium umgeben, so dass ein gerichteter Ionentransport durch die Zelle möglich ist und hieraus eine Polarisierung der Kv1.3 Kanäle an der basalen Membran resultieren könnte. Die Zellen der Primärkultur mit Gelatinebeschichtung zeigen vielfach noch die typischen epithelialen Merkmale von RPE in situ. Vergleicht man das Färbebild dieser Zellen mit der schematischen Darstellung in Abbildung 4.5, scheinen die gefärbten Kv1.3-Kanäle in der basalen und baso-lateralen Zellmembran lokalisiert zu sein. Da über dem Zellkern eine nur sehr geringe Immunoreaktivität vorliegt, ist davon auszugehen, dass die apicale Zellmembran weitgehend frei von Kv1.3-Kanälen ist. Die beschriebenen Zusammenhänge führen zu der These, dass RPE-Zellen in situ lediglich an der basalen und baso-lateralen Membran Kaliumkanäle vom Kv1.3-Typ aufweisen und dass diese Polarisierung im Zuge der Kultivierung unter den beschriebenen Kulturbedingungen entweder sofort oder später aufgehoben wird. Generell sind Ionenkanäle membranständige Proteine; dementsprechend ist

anzunehmen, dass die in dieser Arbeit angefärbten Strukturen ebenfalls membranständig sind. Es ist jedoch auch denkbar, dass der verwendete Primärantikörper an Vorstufen der Kaliumkanäle vom Kv1.3-Typ innerhalb des Zytoplasmas bindet. Eine Differenzierung könnte mit Hilfe eines mittlerweile erhältlichen Antikörpers gelingen, der an einem extrazellulären Epitop der membranständigen Kv1.3-Untereinheit bindet. In diesem Fall könnte auf eine Permeabilisierung der Zellmembran vor dem Auftragen des Primärantikörpers verzichtet werden, so dass theoretisch ausschließlich membranständige Kv1.3-Kanäle angefärbt werden würden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Viele Augenerkrankungen liegen in einer Fehlfunktion des retinalen Pigmentepithels begründet, welche eine Schädigung der Retina und/oder der Choroidea nach sich zieht. Unter den diskutierten Therapiemöglichkeiten erscheinen die Transplantation und die genetische Manipulation von RPE-Zellen viel versprechend. Grundlage für derartige Therapien ist die Etablierung einer Methode, die es erlaubt RPE-Zellen zu kultivieren, die in Funktion und Morphologie möglichst originär sind, so dass Funktionsstudien und Manipulationen in vitro vorgenommen werden können. Die Ausbildung von RPE-typischen Ionenkanälen ist ein wichtiger Marker für den Differenzierungsgrad der kultivierten Zellen.

Die Kultivierung von RPE-Zellen auf den Substraten Gelatine, Fibronektin und Kunststoff bei gleichem Nährmedium (F99RPE) ergibt lediglich geringe Unterschiede in Zellmorphologie und Wachstumstyp. In sämtlichen Kulturen sind in nahezu allen RPE-Zellen Kalium-Kanäle mit Kv1.3-Untereinheiten immunhistochemisch nachweisbar. Darüber hinaus werden diese Kanäle bis in die vierte Subkultur exprimiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das verwendete Nährmedium einen größeren

Einfluss auf die Kultivierung von RPE-Zellen hat als das Kultursubstrat und den Erhalt ihrer Differenzierung gewährleistet. Der immunhistochemische Nachweis der Kv1.3-Kanäle lässt jedoch lediglich eingeschränkt Rückschlüsse auf deren Funktionalität zu. Begleitende Untersuchungen mit der Patch-Clamp-Technik könnten weitere Aufschlüsse liefern, ob sich beispielsweise die Funktion während einer längeren Kulturdauer verändert und ob die bereits nachgewiesene Koppelung an die Regulation der Ca2+-Homöostase bestehen bleibt. Überlegungen über die Rolle der Kv1.3-Kanäle im Ionenhaushalt von RPE-Zellen führten zu der These, dass sie vorwiegend an der basolateralen Zellmembran lokalisiert seien. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen diese These. Unklar bleibt jedoch, ob auch am apicalen Zellpol K+-Kanäle vom Kv1.3-Typ vorkommen. Die bisher erlangten Erkenntnisse über die Rolle von Kv1.3-Kanälen im Ionenhaushalt von RPE-Zellen lassen dies jedoch als unwahrscheinlich erscheinen. In vorliegender Arbeit wird dargelegt, dass auf permeablen Kollagenmembranen kultivierte RPE-Zellen das Differenzierungsmerkmal einer Polarisierung in der Exprimierung von Kv1.3 Kanälen an der basolateralen Membran aufweisen, während RPE-Zellen, die auf unterschiedlichen Kultursubstraten kultiviert wurden, anscheinend apical und basal derartige Kanäle exprimieren.

Diese Arbeit zeigt, dass Kv1.3-Kanäle als Marker zur Beurteilung der Qualität der RPE-Kulturen geeignet sein könnten. Weitere Untersuchungen zur Funktion der Kv1.3-Kanäle im Ionenhaushalt von RPE-Zellen und zum Erhalt dieser Funktion unter der in vorliegender Arbeit beschriebenen Kultivierungsmethode sind notwendig, um diese These zu bestätigen.

6 Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurde mit Hilfe einer immunhistochemischen Nachweismethode die Expression von Kv1.3-Kaliumkanälen in retinalen Pigmentepithelzellen in vivo und in vitro untersucht. Hierbei wurden unterschiedliche Kulturbedingungen verglichen. Es wurden bei gleich bleibendem Kulturmedium die Kultursubstrate Gelatine, Fibronektin und Kunststoff gegenübergestellt. Darüber hinaus wurden RPE-Zellen untersucht, die auf semipermeablen Membranen gezüchtet und in der Primärkultur mit serumfreiem Medium ernährt wurden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass RPE-Zellen in vivo mindestens an der basalen und baso-lateralen Membran Kv1.3-Kanäle ausbilden. Die Expression dieser Kanäle erfolgt ebenfalls bei den in dieser Untersuchung kultivierten RPE-Zellen und dies bis zur vierten Subkultur, unabhängig vom verwendeten Substrat. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung ergibt keine sichere Lokalisierung der exprimierten Kanäle innerhalb der kultivierten RPE-Zellen. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass bei fortschreitender Kultivierung Kv1.3-Kanäle in der apicalen und basalen Membran ausgebildet werden und keine Polarisierung mehr stattfindet. Serumfrei und auf semipermeablen Membranen kultivierte RPE-Zellen hingegen bilden ausschließlich an der basalen beziehungsweise an der baso-lateralen Membran Kalium-Kanäle vom Kv1.3-Typ aus.

7 Literaturverzeichnis

Aiyar, J., J. P. Rizzi, et al. (1996). "The Signature Sequence of Voltage-Gated Potassium Channels Projects into the External Vestibule." J Biol Chem **271**(49): 31013-6.

Aiyar, J., J. M. Withka, et al. (1995). "Topology of the Pore-Region of a K+ Channel Revealed by the Nmr-Derived Structures of Scorpion Toxins." Neuron **15**(5): 1169-81.

Albert, D. M., M. O. Tso, et al. (1972). "In Vitro Growth of Pure Cultures of Retinal Pigment Epithelium." Arch Ophthalmol **88**(1): 63-9.

Alge, C. S., S. Suppmann, et al. (2003). "Comparative Proteome Analysis of Native Differentiated and Cultured Dedifferentiated Human Rpe Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(8): 3629-41.

Baumgartner, I., T. T. Asenbauer, et al. (1992). "Retinal Pigment Epithelial Cells in Post Mortem Hla Typing of Corneal Donors." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(6): 1940-5.

Baumgartner, I., V. Huber-Spitzy, et al. (1989). "Attempts of Tissue Typing from Human Donor Eyes." Ophthalmic Res **21**(3): 268-71.

Bezanilla, F. (2000). "The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels." Physiol Rev **80**(2): 555-92.

Boenisch, T., C. Henne, et al. (2003). Handbuch Immunchemische Färbemethoden.

Boulton, M. E., J. Marshall, et al. (1983). "Retinitis Pigmentosa: A Preliminary Report on Tissue Culture Studies of Retinal Pigment Epithelial Cells from Eight Affected Human Eyes." Exp Eye Res **37**(3): 307-13.

Burke, J. M., C. M. Skumatz, et al. (1996). "Phenotypic Heterogeneity of Retinal Pigment Epithelial Cells in Vitro and in Situ." Exp Eye Res **62**(1): 63-73.

Campochiaro, P. A., J. A. Jerdon, et al. (1986). "The Extracellular Matrix of Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Vivo and Its Synthesis in Vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **27**(11): 1615-21.

Chandy, K. G. (1991). "Simplified Gene Nomenclature." Nature **352**(6330): 26.

Chang, C. W., L. Ye, et al. (1997). "Serum Inhibits Tight Junction Formation in Cultured Pigment Epithelial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(6): 1082-93.

Christie, M. J., R. A. North, et al. (1990). "Heteropolymeric Potassium Channels Expressed in Xenopus Oocytes from Cloned Subunits." Neuron **4**(3): 405-11.

Chung, Y. H., C. Shin, et al. (2001). "Immunohistochemical Study on the Distribution of Six Members of the Kv1 Channel Subunits in the Rat Cerebellum." Brain Res **895**(1-2): 173-7.

Chung, Y. H., C. M. Shin, et al. (2000). "Immunohistochemical Study on the Distribution of Six Members of the Kv1 Channel Subunits in the Rat Basal Ganglia." Brain Res **875**(1-2): 164-70.

Coetzee, W. A., Y. Amarillo, et al. (1999). "Molecular Diversity of K+ Channels." Ann N Y Acad Sci **868**: 233-85.

Cook, K. K. and D. A. Fadool (2002). "Two Adaptor Proteins Differentially Modulate the Phosphorylation and Biophysics of Kv1.3 Ion Channel by Src Kinase." J Biol Chem **277**(15): 13268-80.

Cruickshanks, K. J., R. Klein, et al. (2001). "Sunlight and the 5-Year Incidence of Early Age-Related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study." Arch Ophthalmol **119**(2): 246-50.

Docherty, R. J., J. V. Forrester, et al. (1987). "Type I Collagen Permits Invasive Behaviour by Retinal Pigmented Epithelial Cells in Vitro." J Cell Sci **87 (Pt 3)**: 399-409.

Doubilei, V., J. Bednarz, et al. (2002). "Serum-Free Cultivation of Adult Human Retinal Pigment Epithelial (Rpe) Cells for Transplantation." Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **43**(12): 3450-.

Doyle, D. A., J. Morais Cabral, et al. (1998). "The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K+ Conduction and Selectivity." Science **280**(5360): 69-77.

Dulbecco, R. and G. Freeman (1959). "Plaque Production by the Polyoma Virus." Virology **8**(3): 396-7.

Edwards, R. B. (1982). "Culture of Mammalian Retinal Pigment Epithelium and Neural Retina." Methods Enzymol **81**: 39-43.

Engelmann, K. and M. Valtink (2004). "Rpe Cell Cultivation." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **242**(1): 65-7.

Feeney, L. (1973). "The Phagolysosomal System of the Pigment Epithelium. A Key to Retinal Disease." Invest Ophthalmol **12**(9): 635-8.

Flannery, J. G., W. O'Day, et al. (1990). "Uptake, Processing and Release of Retinoids by Cultured Human Retinal Pigment Epithelium." Exp Eye Res **51**(6): 717-28.

Flood, M. T., C. D. Bridges, et al. (1983). "Vitamin a Utilization in Human Retinal Pigment Epithelial Cells in Vitro." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(9): 1227-35.

Gelfman, C. M., C. M. Kelleher, et al. (1998). "Differentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells in Vitro Uncovers Silencer Activity in the Fgf-5 Gene Promoter." Exp Eye Res **67**(2): 151-62.

Ham, R. G. and W. L. McKeehan (1979). "Media and Growth Requirements." Methods Enzymol **58**: 44-93.

Heiba, I. M., R. C. Elston, et al. (1994). "Sibling Correlations and Segregation Analysis of Age-Related Maculopathy: The Beaver Dam Eye Study." Genet Epidemiol **11**(1): 51-67.

Hernandez, E. V., J. G. Hu, et al. (1995). "Potassium Conductances in Cultured Bovine and Human Retinal Pigment Epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(1): 113-22.

Hewitt, A. T. and D. A. Newsome (1987). "Altered Glycoconjugates in Cultures of Retinitis Pigmentosa Retinal Pigment Epithelium." Prog Clin Biol Res **247**: 79-92.

Hille, B. (1992). Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Sinauer Associates Inc.

Hille, B. (2001). Ion Channels of Excitable Membranes. Sunderland, Mass., Sinauer Assoc.

Ho, T. C. and L. V. Del Priore (1997). "Reattachment of Cultured Human Retinal Pigment Epithelium to Extracellular Matrix and Human Bruch's Membrane." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(6): 1110-8.

Holmgren, M., M. E. Jurman, et al. (1996). "N-Type Inactivation and the S4-S5 Region of the Shaker K+ Channel." J Gen Physiol **108**(3): 195-206.

Höltje, M. B., I. Große, J. Beyer, E. Veh M. Bergmann, R. W. Große, G. Ahnert-Hilger, G. (2007). "Differential Distribution of Voltage-Gated Potassium Channels Kv 1.1-Kv1.6 in the Rat Retina During Development." Journal of Neuroscience Research **85**(1): 19-33.

Hoshi, T., W. N. Zagotta, et al. (1990). "Biophysical and Molecular Mechanisms of Shaker Potassium Channel Inactivation." Science **250**(4980): 533-8.

Hu, J. and D. Bok (2001). "A Cell Culture Medium That Supports the Differentiation of Human Retinal Pigment Epithelium into Functionally Polarized Monolayers." Mol Vis **7**: 14-9.

Hughes, B. A. and R. H. Steinberg (1990). "Voltage-Dependent Currents in Isolated Cells of the Frog Retinal Pigment Epithelium." J Physiol **428**: 273-97.

Hughes, B. A. and M. Takahira (1996). "Inwardly Rectifying K+ Currents in Isolated Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(6): 1125-39.

Hughes, B. A. and M. Takahira (1998). "Atp-Dependent Regulation of Inwardly Rectifying K+ Current in Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells." Am J Physiol **275**(5 Pt 1): C1372-83.

Hughes, B. A., M. Takahira, et al. (1995). "An Outwardly Rectifying K+ Current Active near Resting Potential in Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Am J Physiol **269**(1 Pt 1): C179-87.

Hugnot, J. P., M. Salinas, et al. (1996). "Kv8.1, a New Neuronal Potassium Channel Subunit with Specific Inhibitory Properties Towards Shab and Shaw Channels." Embo J **15**(13): 3322-31.

Isacoff, E. Y., Y. N. Jan, et al. (1991). "Putative Receptor for the Cytoplasmic Inactivation Gate in the Shaker K+ Channel." Nature **353**(6339): 86-90.

Joseph, D. P. and S. S. Miller (1991). "Apical and Basal Membrane Ion Transport Mechanisms in Bovine Retinal Pigment Epithelium." J Physiol **435**: 439-63.

Junqueira, L. C., J. Carneiro, et al. (1991). Histologie: Zytologie, Histologie Und Mikroskopische Anatomie Des Menschen; Unter Berücksichtigung Der Histophysiologie; Mit 20 Tabellen. Berlin [u.a.], Springer.

Karl, M. O., M. Valtink, et al. (2006). "Cell Culture Conditions Affect Rpe Phagocytic Function." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.

Klemic, K. G., G. E. Kirsch, et al. (2001). "U-Type Inactivation of Kv3.1 and Shaker Potassium Channels." Biophys J **81**(2): 814-26.

Koo, G. C., J. T. Blake, et al. (1997). "Blockade of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.3 Inhibits Immune Responses in Vivo." J Immunol **158**(11): 5120-8.

Krüger, R., D. Drexler, et al. (1997). "Optimierung Der Primärkultur Humaner Retinaler Pigmentepithelzellen (Rpe) Zur Einrichtung Einer Zellbank Für Die Rpe-Transplantation." Der Ophthalmologe **94 Suppl. 1**: 192.

Kuryshev, Y. A., T. I. Gudz, et al. (2000). "Kchap as a Chaperone for Specific K(+) Channels." Am J Physiol Cell Physiol **278**(5): C931-41.

Li, C. Y., S. C. Ziesmer, et al. (1987). "Use of Azide and Hydrogen Peroxide as an Inhibitor for Endogenous Peroxidase in the Immunoperoxidase Method." J Histochem Cytochem **35**(12): 1457-60.

Liu, Y., M. E. Jurman, et al. (1996). "Dynamic Rearrangement of the Outer Mouth of a K+ Channel During Gating." Neuron **16**(4): 859-67.

Mannagh, J., D. V. Arya, et al. (1973). "Tissue Culture of Human Retinal Pigment Epithelium." Invest Ophthalmol **12**(1): 52-64.

Marmor, M. F. and T. J. Wolfensberger (1998). The Retinal Pigment Epithelium: Function and Disease. New York [u.a.], Oxford Univ. Press.

Meera, P., M. Wallner, et al. (2000). "A Neuronal Beta Subunit (Kcnmb4) Makes the Large Conductance, Voltage- and Ca2+-Activated K+ Channel Resistant to Charybdotoxin and Iberiotoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(10): 5562-7.

Miller, C. (2000). "An Overview of the Potassium Channel Family." Genome Biology **1**(4).

Miller, S. S. and R. H. Steinberg (1977). "Passive Ionic Properties of Frog Retinal Pigment Epithelium." J Membr Biol **36**(4): 337-72.

Nelson, M. T., J. B. Patlak, et al. (1990). "Calcium Channels, Potassium Channels, and Voltage Dependence of Arterial Smooth Muscle Tone." Am J Physiol **259**(1 Pt 1): C3-18.

Newsome, D. A., B. A. Pfeffer, et al. (1988). "Detection of Extracellular Matrix Molecules Synthesized in Vitro by Monkey and Human Retinal Pigment Epithelium: Influence of Donor Age and Multiple Passages." Exp Eye Res **46**(3): 305-21.

Papazian, D. M., L. C. Timpe, et al. (1991). "Alteration of Voltage-Dependence of Shaker Potassium Channel by Mutations in the S4 Sequence." Nature **349**(6307): 305-10.

Pauleikhoff, D., F. J. van Kuijk, et al. (2001). "[Macular Pigment and Age-Related Macular Degeneration]." Ophthalmologe **98**(6): 511-9.

Peng, S., C. Rahner, et al. (2003). "Apical and Basal Regulation of the Permeability of the Retinal Pigment Epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(2): 808-17.

Pfeffer, B. A. (1991). "Improved Methodology for Cell Culture of Human and Monkey Retinal Pigment Epithelium." Progress in Retinal Research **10**: 251-291.

Pinto, L. H. and D. J. Klumpp (1998). "Localization of Potassium Channels in the Retina." Prog Retin Eye Res **17**(2): 207-30.

Pongs, O. (1992). "Molecular Biology of Voltage-Dependent Potassium Channels." Physiol Rev **72**(4 Suppl): S69-88.

Pongs, O., T. Leicher, et al. (1999). "Functional and Molecular Aspects of Voltage-Gated K+ Channel Beta Subunits." Ann N Y Acad Sci **868**: 344-55.

Priglinger, S. G., C. S. Alge, et al. (2004). "Tgf-Beta2-Induced Cell Surface Tissue Transglutaminase Increases Adhesion and Migration of Rpe Cells on Fibronectin through the Gelatin-Binding Domain." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(3): 955-63.

Quinn, R. H. and S. S. Miller (1992). "Ion Transport Mechanisms in Native Human Retinal Pigment Epithelium." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(13): 3513-27.

Rettig, J., S. H. Heinemann, et al. (1994). "Inactivation Properties of Voltage-Gated K+ Channels Altered by Presence of Beta-Subunit." Nature **369**(6478): 289-94.

Rosenthal, R. and O. Strauss (2002). "Ca2+-Channels in the Rpe." Adv Exp Med Biol **514**: 225-35.

Ryan, J. S., W. H. Baldridge, et al. (1999). "Purinergic Regulation of Cation Conductances and Intracellular Ca2+ in Cultured Rat Retinal Pigment Epithelial Cells." J Physiol **520 Pt 3**: 745-59.

Salkoff, L. B. a. T., M. A. (1986). "Genetics of Ion Channels." Physiological Reviews **66**: 301-329.

Schock, F. and N. Perrimon (2002). "Molecular Mechanisms of Epithelial Morphogenesis." Annu Rev Cell Dev Biol **18**: 463-93.

Schumacher, G.-H. (1991). Kopf, Orofaziales System, Auge, Ohr, Leitungsbahnen. Leipzig [u.a.], Barth.

Segawa, Y. and B. A. Hughes (1994). "Properties of the Inwardly Rectifying K+ Conductance in the Toad Retinal Pigment Epithelium." J Physiol **476**(1): 41-53.

Sewing, S., J. Roeper, et al. (1996). "Kv Beta 1 Subunit Binding Specific for Shaker-Related Potassium Channel Alpha Subunits." Neuron **16**(2): 455-63.

Shahidullah, M., N. Hoshi, et al. (1995). "Slow Inactivation Conserved in Heteromultimeric Voltage-Dependent K+ Channels between Shaker (Kv1) and Shaw (Kv3) Subfamilies." FEBS Lett **371**(3): 307-10.

Shi, G., K. Nakahira, et al. (1996). "Beta Subunits Promote K+ Channel Surface Expression through Effects Early in Biosynthesis." Neuron **16**(4): 843-52.

Sobotta, J. and H. Ferner (1982). Kopf, Hals, Obere Extremitäten. München, Urban & Schwarzenberg.

Sobottka Ventura, A., M. Böhnke, et al. (1996). "Hla-Typisierung Von Spenderhornhäuten Mit Hohen Post-Mortem-Zeiten." Ophthalmologe **93**(3): 262-267.

Song, M. K. and G. M. Lui (1990). "Propagation of Fetal Human Rpe Cells: Preservation of Original Culture Morphology after Serial Passage." J Cell Physiol **143**(1): 196-203.

Spencer, R. H., Y. Sokolov, et al. (1997). "Purification, Visualization, and Biophysical Characterization of Kv1.3 Tetramers." J Biol Chem **272**(4): 2389-95.

Spitznas, M. and M. J. Hogan (1970). "Outer Segments of Photoreceptors and the Retinal Pigment Epithelium. Interrelationship in the Human Eye." Arch Ophthalmol **84**(6): 810-9.

Strauss, O. (2005). "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function." Physiol Rev **85**(3): 845-81.

Strauss, O., F. Buss, et al. (2000). "Activation of Neuroendocrine L-Type Channels (Alpha1d Subunits) in Retinal Pigment Epithelial Cells and Brain Neurons by Pp60(C-Src)." Biochem Biophys Res Commun **270**(3): 806-10.

Strauss, O., S. Mergler, et al. (1997). "Regulation of L-Type Calcium Channels by Protein Tyrosine Kinase and Protein Kinase C in Cultured Rat and Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Faseb J **11**(11): 859-67.

Strauss, O., G. Richard, et al. (1993). "Voltage-Dependent Potassium Currents in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 775-81.

Strauss, O., R. Rosenthal, et al. (2002). "Effects of Protein Kinase C on Delayed Rectifier K+ Channel Regulation by Tyrosine Kinase in Rat Retinal Pigment Epithelial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(5): 1645-54.

Strauss, O., T. Weiser, et al. (1994). "Potassium Currents in Cultured Cells of the Rat Retinal Pigment Epithelium." Comp Biochem Physiol A Physiol **109**(4): 975-83.

Strauss, O. and M. Wienrich (1994). "Ca(2+)-Conductances in Cultured Rat Retinal Pigment Epithelial Cells." J Cell Physiol **160**(1): 89-96.

Strauss, O. and M. Wienrich (1994). "Extracellular Matrix Proteins as Substrate Modulate the Pattern of Calcium Channel Expression in Cultured Rat Retinal Pigment Epithelial Cells." Pflugers Arch **429**(1): 137-9.

Sweeney, M. and J. X. Yuan (2000). "Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction: Role of Voltage-Gated Potassium Channels." Respir Res **1**(1): 40-8.

Takahira, M. and B. A. Hughes (1997). "Isolated Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells Express Delayed Rectifier Type and M-Type K+ Currents." Am J Physiol **273**(3 Pt 1): C790-803.

Tao, Q. and M. E. Kelly (1996). "Calcium-Activated Potassium Current in Cultured Rabbit Retinal Pigment Epithelial Cells." Curr Eye Res **15**(3): 237-46.

Tao, Q., P. E. Rafuse, et al. (1994). "Potassium Currents in Cultured Rabbit Retinal Pigment Epithelial Cells." J Membr Biol **141**(2): 123-38.

Teisseyre, A. and J. W. Mozrzymas (2006). "The Inhibitory Effect of Copper Ions on Lymphocyte Kv1.3 Potassium Channels." J Physiol Pharmacol **57**(2): 301-14.

Tezel, T. H. and L. V. Del Priore (1997). "Reattachment to a Substrate Prevents Apoptosis of Human Retinal Pigment Epithelium." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **235**(1): 41-7.

Tezel, T. H., L. V. Del Priore, et al. (1997). "Harvest and Storage of Adult Human Retinal Pigment Epithelial Sheets." Curr Eye Res **16**(8): 802-9.

Tian, J., K. Ishibashi, et al. (2004). "The Expression of Native and Cultured Rpe Grown on Different Matrices." Physiol Genomics **17**(2): 170-82.

Ueda, Y. and R. H. Steinberg (1993). "Voltage-Operated Calcium Channels in Fresh and Cultured Rat Retinal Pigment Epithelial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(12): 3408-18.

Valtink, M., K. Engelmann, et al. (1999). "Physiological Features of Primary Cultures and Subcultures of Human Retinal Pigment Epithelial Cells before and after Cryopreservation for Cell Transplantation." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **237**(12): 1001-6.

Wells, J., J. Wroblewski, et al. (1993). "Mutations in the Human Retinal Degeneration Slow (Rds) Gene Can Cause Either Retinitis Pigmentosa or Macular Dystrophy." Nat Genet **3**(3): 213-8.

Wen, R., G. M. Lui, et al. (1993). "Whole-Cell K+ Currents in Fresh and Cultured Cells of the Human and Monkey Retinal Pigment Epithelium." J Physiol **465**: 121-47.

West, K. A., L. Yan, et al. (2001). "Proteome Survey of Proliferating and Differentiating Rat Rpe-J Cells." Exp Eye Res **73**(4): 479-91.

Wible, B. A., Q. Yang, et al. (1998). "Cloning and Expression of a Novel K+ Channel Regulatory Protein, Kchap." J Biol Chem **273**(19): 11745-51.

Wollmann, G., S. Lenzner, et al. (2006). "Voltage-Dependent Ion Channels in the Mouse Rpe: Comparison with Norrie Disease Mice." Vision Res **46**(5): 688-98.

Young, R. W. (1987). "Pathophysiology of Age-Related Macular Degeneration." Surv Ophthalmol **31**(5): 291-306.

Zhao, S., L. J. Rizzolo, et al. (1997). "Differentiation and Transdifferentiation of the Retinal Pigment Epithelium." Int Rev Cytol **171**: 225-66.

8 Danksagung

Frau Dipl.-Ing. Monika Valtink danke ich sehr herzlich für die gemeinsame Erarbeitung des Themas und ihre hervorragende Betreuung während jeder Phase der Arbeit. Durch ihre Unterstützung wurde diese Arbeit erst möglich, tausend Dank!

Meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Katrin Engelmann gilt mein Dank für die Überlassung des Themas, ihre Geduld und im Besonderen für ihren Rückhalt während mancher Krisensituation.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß danke ich besonders für den Vorschlag, die Kalium-Kanäle des RPE zum zentralen Thema der Arbeit zu machen und darüber hinaus für seine fachliche Unterstützung bei der Entwicklung einer geeigneten immunhistochemischen Nachweismethode von Kv1.3-Kaliumkanälen in retinalen Pigmentepithelzellen.

Herrn Dr. Mike O. Karl danke ich vielmals für die Herstellung der Mäusehirnschnitte.

Viktoria Zubaty danke ich für die Unterstützung beim Erlernen der immunhistochemischen Färbetechniken und die Anfertigung von unzähligen histologischen Schnitten.

Meinem Freund und Weggefährten Sven Düsing danke ich für seine hilfreiche Mitarbeit und Unterstützung bei den zeitaufwendigen, zehrenden Laborarbeiten.

Meiner Freundin, Kollegin und Praxispartnerin Dr. med. dent. Melanie Bock danke ich für viele nützliche Tipps beim Schreiben der Arbeit und vor allem für ihren Ansporn und uneingeschränkten Rückhalt in unserer gemeinsamen Praxis.

Meinen Eltern Gunna und Basri Gad Farah danke ich unendlich, dass sie mir mein Studium ermöglicht und mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

Meiner geliebten Frau Nina Farah danke ich tausendfach für ihre Unterstützung, Rückhalt, Geduld, Ansporn, Beratung, Korrektur und vieles mehr. Ohne sie wäre ich wenig.

9 Curriculum Vitae

Name:	**Amin Farah**
geboren am:	**11.09.1972 in Buxtehude**
Familienstand:	**verheiratet**
Anschrift:	**Wiesendamm 134, 22303 Hamburg**
Schullaufbahn:	
September 1978 - Juli 1982	**Grundschule Rotkäppchenweg Buxtehude**
September 1982 - Juli 1984	**Orientierungsstufe Schulzentrum Süd Buxtehude**
September 1984 - Juli 1988	**Gymnasium Schulzentrum Süd Buxtehude**
September 1988 - Mai 1991	**Halepaghen-Gymnasium Buxtehude**
Juli 1991	**Abitur**
Studium:	
WS 1993 – WS 1999	**Studium der Zahnmedizin, Universität Hamburg**
im Dezember 1999	**Staatsexamen**
Berufstätigkeit:	
01.04.2000 – 30.09.2000	**Assistenzzahnarzt Praxis Bernd Mattuschka**
01.10.2000 – 30.09.2004	**Assistenzzahnarzt Praxis B. Engler & Dr. C. Urbach**
seit November 2004	**Gemeinschaftspraxis Dr. M. Bock & Amin Farah**

10 Eidesstattliche 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.

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

Unterschrift: .....