Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Direktor: Prof. Dr. med. G. Richard

# Untersuchungen zur Anheftung und Ausbildung interzellulärer Kontakte humaner kornealer Endothelzellen in der Zellkultur und nach Transplantation

### Dissertation

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

#### **Asbed Aintablian**

aus Anjar, Libanon

Hamburg 2003

#### DANKSAGUNG:

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Katrin Engelmann für die Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit.

Ferner danke ich Herrn Dr. rer. nat. Jürgen Bednarz für die Betreuung und für seine hilfreichen Anregungen.

Ich bedanke mich weiterhin bei Herrn Vladimir Doubilei, Frau Monika Valtink und Frau Dr. Julia Weißmann für ihre hilfreichen Hinweise bei der Laborarbeit.

Mein Dank gilt ferner allem Mitarbeiter der Hornhautbank, des Fotolabors und des

histologischen Labors für ihre wertvollen Ratschläge und praktischen Hilfeleistungen.

# **Inhaltsverzeichnis**

1.	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2.	Einleitung	2
2.1	Aufbau der Hornhaut des menschlichen Auges	2
2.2	Das korneale Endothel und seine Funktion	5
2.3	Hornhauttransplantation	6
2.4	Kultivierung von Spenderhornhäuten	8
2.5	Endothelzelltransplantation	9
2.6	Extrazelluläre Matrix und Anheftung der Zellen	10
2.7	Proliferation, Kontaktinhibition und Ausbildung interzellulärer	
	Verbindungen	11
3.	Material und Methoden	12
3.1	Chemikalien und Geräte	12
3.2	Isolierung und Kultivierung kornealer Endothelzellen	13
3.3	Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen	
	auf Spenderhornhäute	14
3.4	Immunhistochemische Färbungen	15
3.5	Proliferation und Kontaktinhibition	16
4.	Ergebnisse	18
4.1	Zellkulturen	18
4.2	Zelltransplantation	19
4.3	Nachweis von Integrin $\beta_1$	21
4.4	Nachweis von ZO1	26
4.5	Färbungen mit dem Antikörper 9.3.E	29
4.6	Nachweis der Zellproliferation und Kontaktinhibition	32
4.7	Proliferation humaner kornealer Endothelzellen in der	
	Hornhautperipherie	35
5.	Diskussion	40
6.	Zusammenfassung	45
7.	Literatur	46

#### Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkaline Phosphatase
ATPase	Adenosin-5´-triphosphatase
bFGF	basischer Fibroblstenwachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
BrdU	5-Brom-2´-desoxy-uridin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix (extra cellular matrix)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Erdbeschleunigung
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase
LSAB	Streptavidin konjugiertes Biotin (Labelled-Streptavidin Biotin)
MDM	modified Dulbecco's medium
NCS	neugeborenen Kälberserum (Newborn calf serum)
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (phosphat buffered solution)
SV40	Simian virus 40
ZO	Verschlusskontakt (Zonula occludens)

#### 1. <u>Arbeitshypothese und Fragestellung</u>

Das korneale Endothel hat zwei wichtige Funktionen, die Barrierefunktion und die Pumpfunktion. Ein starker Verlust von Endothelzellen führt zu einer Dekompensation der Hornhaut. In vivo konnte bisher keine Proliferation des Endothels erreicht werden. Auch nach Zusatz von Wachstumsfaktoren zu Organkulturmedien von Spendergewebe gab es keinen eindeutigen Beweis, dass diese Wachstumsfaktoren langfristig den Endothelzellverlust verhindern oder eine Zellvermehrung bewirken. Die wichtigste Voraussetzung für den Erfolg einer Hornhauttransplantation stellt jedoch die Verwendung von Spendermaterial mit intaktem Endothel hoher Zelldichte dar. Daher wird zurzeit ein hoher Anteil an Spenderhornhäuten nicht zur Transplantation freigegeben, da deren Endothel nicht die geforderte Zelldichte von 2 000 Zellen/mm<sup>2</sup> aufweist.

An der Hornhautbank Hamburg wurde ein Verfahren entwickelt, mit dem kultivierte korneale Endothelzellen auf Spenderhornhäute mit zu geringer Endothelzelldichte transplantiert werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Informationen zur Anheftung der transplantierten Zellen an die Descemet Membran, zur Kontaktinhibition nach Ausbildung eines Monolayers und zur Ausbildung interzellulärer Kontakte gewonnen werden. Es sollte die Synthese von Zelladhäsionsmolekülen der Integrin Familie sowie von Bestandteilen interzellulärer Verbindungen in kultivierten humanen kornealen Endothelzellen nach Transplantation auf humane Spenderhornhäute immunohistochemisch nachgewiesen und mit der Synthese von Zelladhäsionsmolekülen und Zellverbindungen in normalen kornealen Endothelzellen verglichen werden.

Die Ergebnisse sollen zeigen, ob das nach Transplantation ausgebildete Endothel bezüglich der exprimierten Anheftungsfaktoren und Bestandteilen der Zellverbindungen mit einem normalen kornealen Endothel vergleichbar ist. Sollten dabei Unterschiede aufgedeckt werden, so ist zu prüfen ob diesen durch Änderungen der Kulturbedingungen entgegengewirkt werden kann. Außerdem werden die Proliferation und die Kontakt-inhibition der Hornhautendothelzellen immunohistochemisch untersucht.

In jedem Fall werden die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Interaktionen zwischen kornealen Endothelzellen sowie zwischen diesen und ihrer Matrix beitragen. Derartige Studien bringen langfristig das Ziel näher, diejenigen Hornhäute für Keratoplastik nutzbar zu machen, die ursprünglich aufgrund eines unzureichenden Endothels nicht für Keratoplastik geeignet waren und deren Endothel durch Zelltransplantation verbessert bzw. ersetzt wurde.

#### 2. Einleitung

#### 2.1 Aufbau der Hornhaut des menschlichen Auges

Das Auge (Abbildung 2.1) ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen. Elektromagnetische Wellen mit Wellenlängen zwischen 400 und 750 nm werden von ihm wahrgenommen und als elektrochemische Signale an das Gehirn weitergeleitet, so dass mit seiner Hilfe Informationen über die Umwelt vermittelt werden.



Abbildung 2.1: Anatomie des Auges. Der kugelförmige Augapfel wird von der weißen, derben Lederhaut (Sklera), die vorn als durchsichtige Hornhaut (Kornea) ausgebildet ist, eingeschlossen. Innen liegt der Lederhaut die gefäßreiche Aderhaut auf, die an der Hornhautgrenze die ringförmige Regenbogenhaut (Iris) bildet. Durch die Regenbogenhaut hindurch gibt das Sehloch (Pupille) die Sicht frei. Der Aderhaut liegt innen die Netzhaut (Retina) auf, die aus den Sehzellen besteht und die Lichtempfindungen aufnimmt, verarbeitet und über den Sehnerv (Nervus opticus) dem Gehirn zuleitet. Die Stelle des schärfsten Sehens in der Netzhaut ist der Gelbe Fleck (Makula). Das Innere des Auges ist mit dem durchsichtigen Glaskörper ausgefüllt, der dem Augapfel Spannung und Festigkeit verleiht. (Aus: http://www.med1.de/Laien/Krankheiten/Augen )

Die äußere, kugelförmige Hülle des Auges besteht aus straffem Bindegewebe. Den vorgewölbten und durchsichtigen Teil bildet die Hornhaut (Kornea, Abbildung 2.2), an die sich eine weiße Lederhaut, die Sklera, anschließt. Der Hornhautdurchmesser beträgt beim Erwachsenen 10 bis 13 mm. Im Zentrum ist die Hornhaut 0,5 mm dick, in der Peripherie 0,65 mm. Die Hornhaut ist das optische Fenster des Auges, durch sie tritt das Licht in das Auge ein. Sie ist stärker gekrümmt als die Sklera und trägt durch ihre Wölbung am stärksten zur Brechkraft des Auges bei. Die Brechkraft der Linse beträgt

im Vergleich dazu nur 15 Dioptrien. Bei einer Gesamtbrechkraft des dioptrischen Apparates von 58 Dioptrien entfallen 43 Dioptrien auf die Hornhaut, womit sie für das Sehen von wesentlicher Bedeutung ist. Die intakte Feinstruktur der Hornhaut sowie ihre regelmäßige Oberfläche und Transparenz stellen eine Voraussetzung für scharfes Sehen dar.



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung des Vorderaugenabschnittes. Die äußere, kugelförmige Hülle des Auges besteht aus straffem Bindegewebe. Den vorgewölbten und durchsichtigen Teil bildet die Hornhaut (Kornea), an die sich eine weiße Lederhaut (Sklera) anschließt. Die Vorderkammer ist durch Hornhaut und Iris umgrenzt. Sie enthält Flüssigkeit, das sogenannte Kammerwasser, welches die Hornhaut ernährt. Zwischen der Linse und dem Glaskörper liegt ein Raum, der durch die Pupille mit der Vorderkammer verbunden ist und ebenfalls mit Kammerwasser gefüllt ist. Dieser Bereich wird als die Hinterkammer des Auges bezeichnet.

(Aus: http://www.augenoperationen.de/auge\_anatomie.asp)

Die Oberfläche der Hornhaut ist von einem mehrschichtigen, nicht verhornenden Plattenepithel überkleidet. Es besteht aus fünf bis acht Zellschichten, von denen nur die basale Zellschicht regenerationsfähig ist (Matsuda et al. 1986). Die basalen Zellen sitzen einer verdickten Basallamina, der Bowman–Membran, auf und sind in dieser fest verankert. Das Epithel hat eine Dicke von 50  $\mu$ m. 30% seiner Gesamtproteine sind Keratine. Es ist für viele Stoffe undurchlässig und spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Krankheitserregern.

Die nächste Schicht bildet das Hornhautstroma, das ungefähr 90% der Gesamtmasse der Hornhaut ausmacht. Seine Transparenz beruht auf der regelmäßigen, gitterartigen Anordnung von Kollagenfibrillen in einer Grundsubstanz aus sauren Mukopolysacchariden, Keratansulfat und Chondroitinsulfat sowie auf seinem physiologischen Hydrationszustand. Die Kollagenfasern bilden mit der Substanz, in die sie eingebettet sind, ein optisches Gitter. Die eingelagerten Mukopolysaccharide haben die Tendenz, Wasser zu binden, wodurch die Grundsubstanz aufquillt und die Kollagenfasern auseinanderrücken. Überschreitet die Gitterkonstante des Stromas den kritischen Wert von 200 nm, kommt es zur Streuung des Lichts und die Hornhaut erscheint opak (Waltmann und Hart 1987). Zwischen den Kollagenfibrillen befinden sich verzweigte Keratozyten, die für die Bildung der Stromabestandteile verantwortlich sind (Yue und Baum 1976; Newsome et al. 1982; Reim 1985).

Zur Innenseite folgt die Descemet-Membran. Die Descemet-Membran nimmt im Laufe des Lebens kontinuierlich an Dicke zu (Murphy et al. 1984). Ihre Bestandteile sind Kollagene, vor allem Kollagen Typ IV (Newsome et al. 1982; Nakayasu et al. 1986) und Kollagen Typ VIII (Kapoor et al. 1988; Levy et al. 1995) sowie Glykoproteine, wie Fibronektin (Kenney et al. 1982). Der Descemet-Membran sitzt ein einschichtiges Endothel auf, das die Hornhaut zur Vorderkammer hin abgrenzt. Das korneale Endothel besteht aus mosaikartig angeordneten, hexagonalen Zellen (Abbildung 2.3). Es ist kaum regenerationsfähig. Schäden werden durch das Ausbreiten benachbarter Zellen kompensiert.

Das korneale Endothel weist eine Dicke von 4 bis 6  $\mu$ m auf und hat die Aufgabe, sowohl als Barriere zur Vorderkammer als auch als Pumpe, z.B. für notwendigen Nährstofftransport, zu dienen. Auf die Funktion des Endothels wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen.

Zahlreiche Erkrankungen können zu einer Trübung der Hornhaut und nachfolgender Minderung der Sehleistung führen. Hier sind in erster Linie altersbedingte Veränderungen wie die Endothelzellatrophie bei der Fuchs´schen Erkrankung, aber auch die aphake bullöse Keratopathie nach intraokularen Eingriffen am vorderen Augenabschnitt zu nennen. Ebenso können schwere chronische Entzündungen der Kornea oder des Augeninneren zu sekundären Hornhauttrübungen oder zur Vaskularisation führen. Außerdem sind Verbrennungen, Verätzungen und perforierende Traumen zu erwähnen. Hinzu kommen die Hornhautdystrophien erblichen Charakters, wobei an erster Stelle der Keratokonus zu nennen ist.



Abbildung 2.3: Mikroskopische Aufsicht auf ein normales, junges Hornhautendothels. Das Hornhautendothel besteht aus einer einschichtigen Lage von mosaikartig angeordneten, hexagonalen Zellen. Das Endothel hat eine Barriere- und Pumpfunktion, die für die Aufrechterhaltung der Transparenz der Hornhaut von entscheidender Bedeutung ist. Die Barriere wird durch geschlossene Kontakte zwischen den Zellen gebildet. Die normale Kornea weist nach der Geburt des Menschen eine Endothelzelldichte von ca. 3 000 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, was einer Gesamtzahl von ca. 350 000 Endothelzellen pro Hornhaut entspricht (Waring et al. 1982). Unabhängig von Erkrankungen verändert sich das Aussehen des kornealen Endothels mit zunehmendem Lebensalter. Es werden vermehrt vergrößerte Zellen und ein irregulärer Zellverband beobachtet.

(Abbildung aus: http://www.bio-optics.com/articles/02/art0208.htm)

#### 2.2 Das korneale Endothel und seine Funktion

Das korneale Endothel hat, wie im Abschnitt 2.1 ausgeführt, neben der Bildung seiner extrazellulären Matrix, der Descemet-Membran, zwei wichtige Funktionen, die Barrierefunktion und die Pumpfunktion.

Das korneale Endothel dient als Barriere, um einen freien Einstrom von Molekülen aus der Vorderkammer in das Hornhautstroma zu verhindern. Diese Barrierefunktion des kornealen Endothels wird durch die Art der Zellkontakte zwischen den einzelnen Zellen ermöglicht. An den lateralen Enden sind die Zellen untereinander durch tight-junctions ("Verschlusskontakte") miteinander verbunden. Durch diesen Aufbau wird der freie Einstrom von Molekülen aus der Vorderkammer verhindert, andererseits können aber selektiv in Wasser gelöste Nährstoffe in das Stroma diffundieren (Iwamoto und Smelser 1956; Kreutziger 1976; Hirsch et al. 1977).

Die wichtigste Funktion des Endothels ist seine Pumpfunktion. Eine Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in der apikalen Zellmembran der kornealen Endothelzellen transportiert Na<sup>+</sup>-Ionen vom Hornhautstroma in die Vorderkammer. Diesem Transport folgen als Ladungsausgleich HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen und aus osmotischen Gründen Wasser. So wird der physiologische Hydratationszustand aufrechterhalten und die Transparenz der Hornhaut gewährleistet (Reim und Tursset 1968; Dikstein und Maurice 1972; Lütjen - Drecoll und Lönnerholm 1981; Geroski et al. 1985).

Die normale Kornea weist nach der Geburt des Menschen eine Endothelzelldichte von ca. 3 000 Zellen/mm<sup>2</sup> auf, was einer Gesamtzahl von ca. 350 000 Endothelzellen pro Hornhaut entspricht (Waring et al. 1982). Unabhängig von Erkrankungen verändert sich das Aussehen des kornealen Endothels mit zunehmendem Lebensalter. Es werden vermehrt vergrößerte Zellen und ein irregulärer Zellverband beobachtet. Zudem nimmt die Endothelzelldichte ab (Bourne 1976; Laing et al. 1976; Laule et al. 1978; Suda 1984). Ein starker Verlust von Endothelzellen führt zu einer Dekompensation der Hornhaut. Nicht nur durch den Alterungsprozess, sondern auch durch Verletzungen, Krankheiten, und während der Entwicklung der Kornea können Schädigungen des Endothels auftreten. Zu den angeborenen Veränderungen der Hornhaut gehören der Keratokonus posterior, die Peter'sche Anomalie, die hereditäre hintere Endotheldystrophie, die Rieger Anomalität und das infantile Glaukom. Durch diese Erkrankungen wird die Endothelzellfunktion beeinträchtigt. Meist ist die einzige Möglichkeit, Erkrankungen des Endothels zu behandeln, die Hornhauttransplantation, die bisher auch die einzige Therapie bei den erblichen Hornhautdystrophien oder nach Eintrübung der Kornea nach entzündlichen Prozessen ist.

#### 2.3 Hornhauttransplantation

Bei der Hornhauttransplantation (Keratoplastik) wird der eingetrübte oder unregelmäßig gekrümmte zentrale Teil der Hornhaut ersetzt. Mit Hilfe eines Trepans wird ein rundes Scheibchen von 6-8 mm Durchmesser entweder in ganzer Dicke der Kornea (perforierende Keratoplastik) oder nur im Bereich der oberflächlichen und mittleren Gewebsschichten (lamelläre Keratoplastik) entnommen. Anschließend wird in den entstandenen Defekt eine gleichgroße oder geringfügig größere, klare Korneaskleralscheibe eines Spenderauges eingelegt und durch feine Nähte fixiert (Abbildung 2.4).



Abbildung 2.4: Bei der Keratoplastik wird mit einem kreisrunden Trepan eine Scheibe aus einer Spenderhornhaut herausgeschnitten und unter einem Operationsmikroskop in die Wirtshornhaut mit feinstem Nahtmaterial eingenäht, nachdem dort vorher ein gleich großen Hornhautstück entnommen wurde.

(Aus: http://www.onjoph.com/Artikel/DOC2001\_KPL/DOC2001\_kpl\_body\_2.htm)

Die perforierende oder penetrierende Keratoplastik ist eine der ältesten Transplantationen der Medizin und wurde vermutlich erstmals von de Quengsy vorgeschlagen (de Quengsy 1789). Trotz einiger weiterer Überlegungen in den folgenden Jahren (Darwin 1797; Himly 1813) nahm sich erst 1818 Reisinger, ein Schüler Himlys, dieses Themas an und startete eine Reihe von Tierexperimenten. Diese endeten sämtlich in der Eintrübung des transplantierten Gewebes, ebenso hatte Dieffenbach nur Misserfolge vorzuweisen (Dieffenbach 1831). Die erste erfolgreiche Hornhauttransplantation gelang schließlich dem Iren Bigger in arabischer Gefangenschaft an einer Gazelle mit homologem Spendermaterial (Bigger 1837).

Ein erster Versuch am Menschen, dem eine Schweinehornhaut transplantiert wurde, war nicht erfolgreich (Kissam 1844).

Die Grundlagen für eine perforierende Keratoplastik wurden schließlich von Power entwickelt (Power 1872). Zu ihnen zählten bereits damals die Verwendung frischen, homologen Gewebes, die Schonung des Endothels, sorgfältige Nahttechnik und Vermeidung von Infektionen. Mit Erweiterung der Kenntnisse über Anatomie und Physiologie der Kornea wurden verbesserte Vorraussetzungen für die Transplantationen einer Hornhaut geschaffen. Die erste erfolgreiche perforierende Keratoplastik beim Menschen der Weltliteratur, seinerzeit als Hornhautpfropfung bezeichnet, wurde 1906 von Zirm publiziert: Einem Patienten, der nach einer Kalkverätzung beidseitig durch Hornhautnarben erblindet war, wurde eine Kornea aus einem frisch enukleierten, verletzten Auge übertragen (Zirm 1906). Bis zum endgültigen Erfolg der Keratoplastik verging dann noch mehr als ein halbes Jahrhundert, u.a. weil über die wichtige Funktion des Endothels nur unzureichende Kenntnisse vorhanden waren. Heute weiß man, dass der Zustand des Endothels das wichtigste Qualitätsmerkmal einer Spenderhornhaut ist. Da das menschliche korneale Endothel in vivo nicht oder nur sehr begrenzt teilungsfähig ist (Klyce und Beuermann 1988), sollte bei der Hornhauttransplantation ein möglichst vitales Endothel mit hoher Endothelzelldichte transplantiert werden. Spenderhornhäute, deren Endothelzelldichte unter 2 000 Zellen/mm<sup>2</sup> liegt, werden nicht für eine Hornhauttransplantation verwendet (European Eye Bank Association Directory 2002).

#### 2.4 Kultivierung von Spenderhornhäuten

Die Bereitstellung von qualitativ guten Hornhäuten zur Keratoplastik und deren Bewahrung über einen möglichst langen Zeitraum ist die Aufgabe der Hornhautbanken geworden. Zur Konservierung der Spenderhornhäute ist an der Hornhautbank der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf seit 1985 die Langzeit-Organkultur (bis zu vier Wochen) etabliert, zu deren Vorteilen die planmäßige Versorgung von Patienten und die Bereitstellung von Spenderhornhäuten zählen.

Ob eine Spenderhornhaut zur Transplantation geeignet ist, wird anhand definierter Qualitätskriterien entschieden. Das Hauptaugenmerk wird auf den Zustand des kornealen Endothels gelegt. Daher wird ein Endothelbefund routinemäßig nach Präparation und vor Transplantation erhoben. Beurteilt werden die Zellmorphologie, die Endothelzelldichte, aber auch der Endothelzellverlust während der Organkultur.

#### 2.5 Endothelzelltransplantation

Zurzeit werden in Deutschland jährlich etwa 4500 Hornhauttransplantationen (Keratoplastiken) durchgeführt. Der Bedarf an Spenderhornhäuten wird jedoch erheblich höher geschätzt. Von den zur Verfügung stehenden Spenderhornhäuten werden jedoch etwa 30% aufgrund einer zu geringen Endothelzelldichte nicht für eine Keratoplastik freigegeben. Das liegt zum Teil daran, dass Spenderhornhäute zumeist von älteren Verstorbenen stammen und bereits häufig eine reduzierte Endothelzelldichte aufweisen. Hinzu kommt ein unvermeidbarer Endothelzellverlust durch die Organkonservierung und das chirurgische Trauma. In vivo, d.h. am menschlichem Auge, konnte bisher keine Proliferation des Endothels erreicht werden. Auch nach Zusatz von Wachstumfaktoren zum Kulturmedium von Spendergewebe gab es keinen eindeutigen Beweis, dass diese Wachstumfaktoren langfristig den Endothelzellverlust verhindern oder eine Zellvermehrung bewirken (Barisani-Asenbauer et al. 1997).

Eine alternative und vielversprechende Methode, die Qualität des Endothels von Spenderhornhäuten zu verbessern, ist die Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen. Transplantationen mit kultivierten Rinderendothelzellen (Alvarado, Gospodarowicz und Greenburg 1981) und Kaninchenendothelzellen (Schwartz und McCulley 1981) konnten zeigen, dass der Ersatz der Endothelzellen möglich ist und dass die Zellen ihre Funktionsfähigkeit wiedererlangen können. An der Hornhautbank der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde eine Methode entwickelt, um kultivierte humane korneale Endothelzellen auf Spenderhornhäute mit unzureichendem Endothel zu übertragen und diese so, mit einem qualitativ hochwertigem Endothel auszustatten (Engelmann et al. 1993, 1999a und b). Die so behandelten Hornhäute wiesen vergleichbare morphologische und funktionelle Eigenschaften auf zu normalen organkonservierten Spenderhornhäuten (Böhnke et al. 1999; Aboalchamat et al. 1999). Über die Art der Anheftung der transplantierten Endothelzellen und die Bildung von interzellulären Verbindungen liegen jedoch noch keine Ergebnisse vor. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anheftung der transplantierten Zellen an die Descemet Membran und die sich anschließende Bildung von interzellulären Verbindungen untersucht werden.

#### 2.6 Extrazelluläre Matrix und Anheftung der Zellen

In den Geweben eines Organismus gehen die Zellen gewöhnlich eine enge Verbindung mit extrazellulären Makromolekülen ein, die meist von den Zellen selber produziert werden. Die extrazellulären Makromoleküle bilden komplexe, dreidimensionale Netzwerke aus, die als extrazelluläre Matrix (ECM) bezeichnet werden. Struktur und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix hängen vor allem von den gewebetypischen, matrixproduzierenden Zellen und der Gewebsfunktion ab. Diese Substanz ist weit mehr als ein einfacher Kitt. Je nach ihrer Zusammensetzung hat sie mannigfaltige Rückwirkungen auf die Zelle: Sie bestimmt die Form, die Beweglichkeit, die Aktivität einer Zelle und nimmt Einfluss auf deren Entwicklung. Je nach Art des multizellulären Komplexes variiert ihre Konsistenz. Glycosaminoglykane und fibrilläre Proteine (Kollagen, Elastin, Fibronektin) sind die Hauptbestandteile der ECM. Die Descemet-Membran ist die extrazelluläre Matrix humaner kornealer Endothelzellen.

Man geht heute davon aus, dass die extrazelluläre Matrix für die eingebetteten Zellen eine Informationsquelle und Funktionshilfe besonderer Qualität darstellt. Informationen können die eingebetteten Zellen auf zwei Wegen erreichen: als im Gewebssaft gelöste Botenstoffe (Wachstumsfaktoren, Inhibitoren, Hormone, Zytokine) und als Informationen, die durch spezielle Rezeptorbindungen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix vermittelt werden. Dabei stellen lösliche Botenstoffe wahrscheinlich kurzfristig variable, stark veränderliche Informationen dar. Durch Bindung der Zelle an die extrazelluläre Matrix könnte ein stabiler Informationsfluss von möglicherweise hoher regionaler Spezifität zustande kommen.

Die Anheftung von Zellen wird häufig über Integrine vermittelt. Integrine sind transmembrane Proteine, die aus je einer  $\alpha$  und einer  $\beta$  Untereinheit bestehen und mit dem Cytoskelett der Zellen verbunden sind (Hynes 1987). Bisher sind mindestens 25 verschiedene Integrine beschrieben worden, die aus unterschiedlichen Kombinationen aus 12  $\alpha$  und 9  $\beta$  Untereinheiten bestehen. Zum Beispiel stellt Integrin  $\alpha_3\beta_1$  einen weitverbreiteten Rezeptor für Fibronektin, Kollagen und Laminin dar (Wayner und Carter 1987). Integrin  $\alpha_2\beta_1$  vermittelt eine Bindung an Kollagen I und Kollagen IV sowie an Laminin (Languino et al. 1989). Kollagene, Fibronektin und Laminin stellen die Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix humaner kornealer Endothelzellen dar.

### 2.7 Proliferation, Kontaktinhibition und Ausbildung interzellulärer Verbindungen

Während der Entwicklung wird das Endothel durch Migration neuroektodermaler Zellen der Augenperipherie gebildet. Die Proliferation der Endothelzellen hört auf, sobald die Zellen einen funktionsfähigen Monolayer gebildet haben (Kontaktinhibition). Es werden zwischen den Zellen tight junctions ("Verschlusskontakte") gebildet. Neben der Anheftung an die extrazelluläre Matrix ist die Ausbildung dieser interzellullärer Verbindungen für die Funktion der Zellen von entscheidender Bedeutung. Zur Aufrechterhaltung der kornealen Transparenz erzeugen die Endothelzellen einen Bikarbonatgradienten. Dieser Gradient kann nur aufgebaut werden, wenn die Zellen einen dichten Zellverband mit Verschlusskontakten bilden. In den Verschlusskontakten sind die äußeren Plasmamembran-Schichten zweier benachbarter Zellen dicht aneinander gerückt, so dass der Interzellularraum zwischen ihnen aufgeschoben ist. Transmembranproteine, wie Occludin, rücken von beiden Seiten Kopf an Kopf dicht zusammen und bilden eine feste Naht, die gürtelförmig um die Zellen verläuft. Je mehr derartige Nähte aneinander gelegt sind, umso undurchlässiger ist der Kontakt.

#### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien und Geräte

Das Medium F99 ist eine 1+1 Mischung der Medien Ham's F12 und M199 Earle's Medium. Beide Medien, sowie eine 1+1 Mischung der Medien Iscove's MDM und Ham's F12 für die Züchtung der Primärkulturen, wurden als Pulverform von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Trypsin/EDTA (0,05/0,02%) wurde auch von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen. Das Wasser zum Ansetzen des pulverförmigen Mediums wurde in einer Millipore-Reinstwasser-Anlage gewonnen. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solution (PBS) mit bzw. ohne Calcium und Magnesium, fetales Kälberserum und bFGF waren von Seromed (Biochrom KG, Berlin). Natriumhydrogencarbonat war von der Firma Merck (Darmstadt). Die Kulturschalen wurden von Greiner (Solingen), sowie von Costar (Cambridge, MA) bezogen. Die chamber slides waren von der Firma Nunc (Wiesbaden). Das Insulin, Kollagenase Typ IV, die Ascorbinsäure und das D-Valin waren von Sigma (Steinheim).

Für die immunohistochemischen Färbungen wurde das DAKO LSAB<sup>®</sup>2 System, Alkaline Phosphatase Kit verwendet. Es wurden auch eine Hematoxylinlösung (HARRIS<sup>'</sup>, Merck) und ein Blockierungsreagenz (DAKO) verwendet.

Das Thymidin Analogon 5-Brom-2´-desoxy-uridin (BrdU) (Roche, Mannheim) und Antikörper gegen folgende Proteinen wurden verwendet: integrin  $\beta_1$  (Klon K20, Dako, Hamburg), integrin  $\alpha_2\beta_1$  (Klon P1E6, Dako, Hamburg), integrin  $\alpha_3\beta_1$  (Klon P1B5, Dako, Hamburg), ZO-1 (Klon BM173, DPC Biermann, Bad Nauheim), Ki-67 (Klon MIB-1, Dako, Hamburg), BrdU (Klon BMC 9318, Roche, Mannheim). Antikörper wurden im speziellen DAKO puffern verdünnt (DAKO Antibody Diluent with background reducing Components).

Es wurde auch der in unserem Labor hergestellte Antikörper 9.3.E gegen humane korneale Endothelzellen (Engelmann et al 2001) verwendet.

Die folgende Geräte wurden für den Versuchen verwendet: Brutschränke (Heraeus), eine Zentrifuge (Heraeus Sepatech, Omnifuge 2.0 RS), ein Zellzählgerät (Coulter®, particle count and size analyzer).

#### 3.2 Isolierung und Kultivierung kornealer Endothelzellen

In dieser Arbeit wurden sowohl frisch isolierte als auch durch SV40 Transfektion immortalisierte humane korneale Endothelzellen (Bednarz et al. 2000) verwendet. Korneale Endothelzellen wurden nach der Methode von Engelmann et al. (1988) von Spenderhornhäuten, die für eine Keratoplastik ungeeignet waren, isoliert. Zur Anzucht der humanen kornealen Endothelzellen wurde ein Selektionsmedium verwendet, das die Proliferation der kornealen Endothelzellen durch den Zusatz von Wachstumsfaktoren förderte aber gleichzeitig das Wachstum schnell proliferierender Keratozyten hemmte (Engelmann und Böhnke 1990). Letzteres wurde durch den Austausch von L-Valin durch D-Valin erreicht. Fibroblasten können D-Valin nicht in L-Valin umwandeln, aber korneale Endothelzellen können D-Valin mit dem Enzym D-Aminoxidase über ein Zwischenprodukt (2-Ketoisovaleriansäure) in seine L-form überführen. Das Basalmedium setzt sich zusammen aus einer 1+1 Mischung von Iscove's MDM und Ham's F12. Dazu wurde D-Valin (52 mg/l) hinzugefügt. Für die Isolierung der Zellen wurde eine Kollagenase Typ IV-Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml Kollagenase Typ IV in Basalmedium hergestellt. Spenderhornhäute wurden in eine 24-Lochschale mit dem Endothel nach oben gelegt. In die Wölbung wurden 50 µl der Enzymlösung gegeben. Die Hornhäute wurden 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Korneoskleralscheibe über ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gehalten. Die Endothelzellen wurden mit 20 ml Basalmedium, mittels einer Spritze, durch eine dünne Kanüle, abgespült. Die Zellen wurden bei 300xg 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 0,5 ml Selektionsmedium Komplett (das Basalmedium wurde mit 7,5% NCS, 7,5% FCS, jeweils dialysiert, Insulin und Ascorbinsäure (jeweils 1µg/ml), bFGF 10 ng/ml supplementiert) aufgenommen und in ein Loch einer 24-Lochschale ausgesät. Nach vier Stunden wurde der Überstand aus dem Loch abgenommen und in ein neues Loch pipettiert. In das erste Loch wurde 0,5 ml frisches Medium (Selektionsmedium Komplett) gefüllt.

Für die weitere Kultivierung der frisch isolierten Zellen (nach den ersten zwei Passagen), sowie für die Kultivierung der transfizierten Zellen, wurde das Basalmedium F99 mit 5% FCS und bFGF (10ng/ml) verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>-Begasung im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Die Zellen wurden passagiert, nachdem diese eine konfluente Zellschicht, einen Monolayer, gebildet hatten. Für die Zellen hat sich ein Umsetzungsverhältnis von eins zu vier bewährt, d.h. die auf einer 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche konfluent gewachsenen Zellen wurden auf vier 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät. Zum Passagieren mussten die Zellen, nachdem sie dreimal mit Basalmedium gewaschen worden waren, in Suspension gebracht werden. Hierzu wurden die Zellen enzymatisch von der Zellkulturplatte gelöst. Eine Trypsin /EDTA-Lösung wurde auf den Monolayer getropft. Die Zellen wurden mit dieser Lösung 5 Minuten unter Schwenken inkubiert und anschließend in PBS oder Medium aufgenommen. Wenn sich die Zellen nur unvollständig ablösten, ein häufig zu beobachtendes Phänomen bei den stark adhärenten Primärkulturen, wurde der Vorgang wiederholt. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 100g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit Kulturmedium aufgenommen und auf die vorbereiteten Kulturgefäße bzw. auf chamber slides, für immunohistochemische Färbung, verteilt.

# **3.3** Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen auf Spenderhornhäute

Korneale Endothelzellen wurden nach der Methode von Engelmann et al. (1993) auf menschliche Spenderhornhäute transplantiert. Dafür wurden Spenderhornhäute, die zur Keratoplastik nicht geeignet waren, verwendet. Unmittelbar vor der Zelltransplantation wurden noch vorhandene Endothelzellen mechanisch entfernt. Dazu wurden 20 ml Medium durch eine feine Kanüle über die Descemet der Hornhaut gespritzt. Die kultivierten Zellen wurden, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben, in Suspension gebracht und mit einem Coulter counter gezählt. Es wurde für jede Hornhaut ein Alliquot der Zellsuspension mit 50 000 Zellen mit Medium auf 150 µl aufgefüllt und auf die Hornhaut aufgebracht. Nach der Zelltransplantation wurden die Hornhäute in Medium F99 zunächst mit täglich absteigender FCS-Konzentration (20%, 10%, 5%) und anschließend gleich bleibender Konzentration von 5% FCS bei 37° C inkubiert. Alle sieben Tage wurden die Hornhäute mikroskopisch befundet, um die Ausbildung des Endothels zu beobachten. Nach 4 Wochen wurden von den Hornhäuten Kryoschnitte angefertigt. Die Schnitte konnten anschließend für immunohistochemische Färbungen verwendet werden.

Zum Vergleich wurden auch Schnitte von Spenderhornhäuten mit eigenen Endothelzellen, die für eine Keratoplastik nicht geeignet waren, angefertigt. Von einigen Hornhäuten wurde die Descemet Membran unter einem Operationsmikroskop mit Hilfe feiner Pinzetten zusammen mit dem Monolayer der Endothelzellen mechanisch von der Hornhaut entfernt (Bednarz et al. 1998) und anschließend für immunohistochemische Färbungen verwendet.

#### 3.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbemethoden werden nach direkter oder indirekter Färbung unterschieden. Bei der direkten Methode wird ein enzymgekoppelter spezifischer Antikörper eingesetzt, der mit einem bestimmten Gewebsantigen reagiert. Bei der indirekten Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Ein zweiter enzymmarkierter Antikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist, reagiert mit dem Primärantikörper. Eine besondere Art der indirekten Färbemethode ist die Labelled-Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode), bei der ein biotinylierter Brückenantikörper mit einem Streptavidinmoleküle reagiert, welches mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. In dieser Arbeit wurde das DAKO LSAB<sup>®</sup>2 System, Alkaline Phosphatase Kit verwendet. Dieses Kit ist bei Primärantikörpern aus Maus oder Kaninchen einsetzbar. Das Kit enthält Fuchsin Chromogen Komponenten als Substrat für die Alkaline Phosphatase. Am Ende werden die Antigene durch eine Rotfärbung sichtbar gemacht.

Vorbereitend zur Färbung wurden die Zellen bzw. die abgezogenen Descemet-Membranen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend bei -20°C zehn Minuten in 70% igem Ethanol in 50mM Glyzinpuffer (pH 2) fixiert. Die Zellen wurden mit dem ersten Antikörper 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Färbung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Nach einem dreimaligen Waschen mit PBS wurden die Proben 10 Minuten mit dem Brückenantikörper inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten mit Streptavidin-AP inkubiert. Zwischenzeitlich wurde eine Substrat-Chromogen-Lösung hergestellt indem zunächst 3 Tropfen Fuchsin Chromogen mit 3 Tropfen Aktivator (Fuchsin Activating Agent) in einem Röhrchen 1 Minute gemischt und anschließend mit Fuchsin Substrate Puffer auf 2 ml aufgefüllt wurden. Die Zellen wurden noch 3-mal mit PBS gewaschen und 10 Minuten mit der Substrat-Chromogen-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben einmal mit Wasser gewaschen und mit einem Deckglas eingedeckt. Wenn angegeben wurde vor der Eindeckung eine Gegenfärbung mit Hematoxylinlösung (1/10 verdünnt in Wasser 5 Minuten) durchgeführt.

Die Kryoschnitte (Kapitel 3.3) wurden zuerst 5 Minuten mit Aceton fixiert und 3-mal mit Tris-Puffer gespült. Anschließend 10 Minuten mit Blockierungsreagenz inkubiert und noch 3-mal mit Tris-Puffer gespült. Die weiteren Schritte wurden auch nach Anleitung des Herstellers, wie in vorhergehendem Absatz beschrieben, durchgeführt.

#### 3.5 Proliferation und Kontaktinhibition

Die Proliferation kultivierter kornealer Endothelzellen wurde durch den Einbau des Thymidin Analogons 5-Brom-2'-desoxy-uridin (BrdU) in neu synthetisierte DNS untersucht. Hierzu wurde dem Zellkulturmedium 36 Stunden vor der immunohistochemischen Färbung BrdU (Endkonzentration 10 mM) zugefügt. Vorbereitend zur Färbung wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend bei -20°C zehn Minuten in 70%igem Ethanol in 50 mM Glyzinpuffer (pH 2) fixiert. Anschließend wurden die Zellen, zur Denaturierung der DNS, 60 Minuten mit 2N HCl bei 37° C inkubiert und anschließend 2-mal mit 10 mM Borat-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden mit dem ersten Antikörper (Maus-anti-BrdU, Roche, Mannheim) 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die weitere Färbung wurde mit dem DAKO LSAB<sup>®</sup>2 System, wie im Kapitel 3.4 beschrieben, durchgeführt.

Alternativ wurde die Proliferation kornealer Endothelzellen durch den Nachweis des Proliferation-assoziierten Proteins Ki67 untersucht. Die immunlogischen Färbungen wurden ebenfalls mit dem DAKO LSAB<sup>®</sup>2 System durchgeführt, wie im Kapitel 3.4 beschrieben.

Um die Proliferation der humanen kornealen Endothelzellen in situ zu untersuchen, wurden sowohl Skleralringe (Spenderhornhäute deren Zentrum für eine Keratoplastik verwendet wurde) als auch ganze Spenderhornhäute, die nicht für eine Keratoplastik geeignet waren, verwendet. Die Descemet Membran der intakten Spenderhornhäute wurden mit Trepanen von 6,5 und 9,0 Millimeter Durchmesser in drei Zonen unterteilt: äußere Peripherie (der Bereich, der weiter als 9 mm vom Mittelpunkt der Hornhaut entfernt ist), mittlere Peripherie (der Bereich in einer Entfernung zwischen 6,5 mm und 9 mm vom Mittelpunkt) und Zentrum (der zentrale, kreisförmige Bereich bis zu einer Entfernung von 6,5 mm vom Mittelpunkt). Die Hornhäute und Skleralringe wurden nach Trepanation 5 Stunden in Medium F99 mit 5% FCS inkubiert. Anschließend wurden die Descemet Membranen der Skleralringe sowie der intakten Spenderhornhäute unter einem Operationsmikroskop, mit Hilfe feiner Pinzetten, zusammen mit dem Monolayer der Endothelzellen entfernt. Die abgezogenen Descemet Membranen wurden über Nacht in Medium F99 mit 5% FCS inkubiert. Für den Nachweis der DNS-Synthese wurde dem Medium 10 mM BrdU zugefügt. Am nächsten Morgen wurden die Descemet Membranen, wie oben für die Zellkulturen beschrieben, in PBS gewaschen und in 70% Ethanol in Glycin-Puffer fixiert. Auch die weitere Behandlung erfolgte analog zu der oben beschriebenen Färbung der Zellkulturen.

#### 4. Ergebnisse

#### 4.1 Zellkulturen

Für die Isolierung von Endothelzellen standen 25 Spenderhornhäute, die für eine Keratoplastik ungeeignet waren, zur Verfügung. Von 10 Hornhäuten konnten Primärkulturen etabliert werden. Die Zellen waren gleichmäßig groß und wuchsen in Gruppen (Abbildung 4.1). Ab der vierten Passage zeigten die Zellen verminderte Proliferation und Anzeichen von Seneszenz wie Zellvergrößerung und Auftreten von zellulären Einschlüssen.



Abbildung 4.1: Humane korneale Endothelzellen in der Primärkultur. Die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme zeigt eine Kultur 4 Tage nach der Isolierung. Die Zellen zeigen die für humane korneale Endothelzellen typische polygonale Morphologie. Überlebensfähige Zellen traten meistens in Gruppen auf. (Balkenlänge entspricht 100 μm)

Die SV40 transfizierten Zellen proliferierten immer gleichmäßig stark und die Kulturen wiesen innerhalb von 10 Tagen Konfluenz auf (Abbildung 4.2). Die Zellen zeigten ebenfalls eine polygonale Morphologie.



Abbildung 4.2: SV40 transfizierte humane korneale Endothelzellen nach 3 Tage (a) und nach 10 Tage (b) in der Zellkultur. (Balkenlänge entspricht 100 μm)

#### 4.2 Zelltransplantation

Kultivierte, SV 40 transfizierte humane korneale Endothelzellen wurden auf 12 Spenderhornhäute transplantiert. Nach 2 Wochen wurde das neugebildete Endothel mikroskopisch untersucht. Es fand sich ein geschlossenes Endothel aus polygonalen Zellen (Abbildung 4.3). Fünf Hornhäute wurden für weitere zwei Wochen kultiviert. Im Anschluss an diese vierwöchige Kultivierung wurden von diesen Hornhäuten Kryoschnitte hergestellt und für immunohistochemische Färbungen verwendet (Abbildung 4.3).



Abbildung 4.3: SV40 transfizierte humane korneale Endothelzellen nach Transplantation auf Spenderhornhäute. Auf dem linken Photo ist das nach zwei Wochen gebildete geschlossene Endothel aus polygonalen Zellen in der Aufsicht zu sehen (a). Das rechte Photo zeigt einen Kryoschnitt 4 Wochen nach der Transplantation (b). Es ist deutlich zu erkennen, dass die Zellen einen Monolayer gebildet haben. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

Zum Vergleich wurden auch Schnitte von Spenderhornhäuten mit eigenen Endothelzellen angefertigt, die für eine Keratoplastik nicht geeignet waren (Abbildung 4.4). Auf diesen Schnitten ist das geschlossene Endothel als Monolayer deutlich zu erkennen. Eine deutliche Aufsicht auf den Monolayer war besonders gut möglich, nachdem die Descemet Membran zusammen mit den adhärenten Endothelzellen unter einem Operationsmikroskop von der Spenderhornhaut entfernt und anschließend mikroskopisch untersucht wurde (Abbildung 4.5). Die Trennung der Descemet Membran mit den Endothelzellen von der übrigen Hornhaut hatte den Vorteil, dass beim Mikroskopieren die Zellen bzw. zelluläre Strukturen nur durch die klare Descemet Membran mikroskopiert werden können und nicht durch das gesamte Stroma was zu einer deutlich geringeren Lichtbrechung und damit zu deutlich schärferer Darstellung führt. Beim Abziehen der Descemet Membran von den Hornhäuten mit transplantierten Endothelzellen kam es jedoch immer zu einem vollständigen Ablösen der Zellen. Daher konnten immunologische Färbungen nur an transplantierten Zellen durchgeführt werden, die sich auf der Spenderhornhaut befanden. Die Minderung der Hornhauttransparenz durch den Färbeprozess erschwerte jedoch die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse.



 Abbildung 4.4: Vergleichschnitte von Spenderhornhäuten mit eigenen Endothelzellen nach einfacher Hematoxillin Färbung (a) und nach Hematoxillin-Eosine Färbung (b). während das korneale Endothel (schwarze Pfeile) aus einem Monolayer besteht, ist das Epithel (weiße Pfeile) mehrschichtig aufgebaut. (Balkenlänge entspricht 150 μm)



Abbildung 4.5: Descemet Membran mit anheftenden Endothelzellen einer Spenderhornhaut. Die Descemet Membran wurde unter einem Operationsmikroskop, mit Hilfe feiner Pinzetten von der Spenderhornhaut entfernt. Die Endothelzellen sind deutlich auf der klaren Membran zu erkennen. (Balkenlänge entspricht 50µm)

#### 4.3 Nachweis von Integrin $\beta_1$

Integrin  $\beta_1$  wurde mit Hilfe monoklonaler Antikörper im kornealen Endothel kultivierter Spenderhornhäute nachgewiesen. Einerseits wurden für die Färbungen isolierte Descemet Membranen mit Endothel verwendet, um die Verteilung von Integrin  $\beta_1$ innerhalb des Zellverbandes zu untersuchen (Abbildung 4.6), andererseits wurden Querschnitte von Spenderhornhäuten verwendet, um den Bereich der Anheftung der Endothelzellen an die Descemet Membran darzustellen (Abbildung 4.7). Nach den Färbungen zeigte sich, dass Integrin  $\beta_1$  innerhalb des Endothelverbandes gleichmäßig verteilt vorkommt. Auch auf den Querschnitten erschienen alle Bereiche der Zellmembran gefärbt. Integrin  $\beta_1$  ist also nicht ausschließlich auf den Bereich der



Abbildung 4.6: Immunhistochemischer Nachweis von Integrin  $\beta_1$  in kornealen Endothelzellen einer kultivierten Spenderhornhaut. Die Zellen wurden auf der isolierten Descemet Membran gefärbt, d. h. vor der Färbung wurde das Endothel zusammen mit der Descemet Membran von der Hornhaut entfernt. Es ist zu sehen, dass Integrin  $\beta_1$  innerhalb des Endothelverbandes gleichmäßig verteilt vorkommt. (Balkenlänge entspricht 25 µm)



Abbildung 4.7: Immunhistochemischer Nachweis von Integrin β<sub>1</sub> in einem Querschnitt durch eine Spenderhornhaut. Die Endothelschicht wies eine deutliche Färbung auf, während das darunter befindliche Stroma keine Färbung zeigte. Das Epithel, das ebenfalls eine Färbung aufwies, ist in der Abbildung nicht mit dargestellt. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

Expression von Integrin  $\beta_1$  wurde auch während der Kultivierung humaner kornealer Endothelzellen untersucht. Expression dieses Proteins erfolgte sowohl während der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 4.8), als auch nach Ausbildung eines konfluenten Zelllayers (Abbildung 4.9). Nach den Färbungen zeigte sich, dass Integrin  $\beta_1$  sowohl in Primärkulturen als auch in der SV40 transfizierten Endothelzelllinie relativ gleichmäßig verteilt vorkommt. Nur in den konfluenten Kulturen erschien die Färbung in den interzellulären Bereich intensiver.



Abbildung 4.8: Immunhistochemischer Nachweis von Integrin β<sub>1</sub> in einer Primärkultur humaner kornealer Endothelzellen (a) und in SV40 transfizierten Endothelzellen (b) vier Tage nach dem Passagieren der Zellen, also innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase der Zellen. (Balkenlänge entspricht 50 μm).



 Abbildung 4.9: Immuncytochemischer Nachweis von Integrin β<sub>1</sub> in einer Primärkultur humaner kornealer Endothelzellen (a) und in der SV40 transfizierten Endothelzelllinie (b) 14 Tage nach dem Passagieren der Zellen, also nach Ausbildung eines geschlossenen Zellverbandes. Es ist zu sehen, dass nach Ausbildung eines konfluenten Zelllayers die relativ gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zellen erhalten bleibt. Jedoch erscheint die Färbung in den interzellulären Bereichen etwas intensiver. (Balkenlänge entspricht 50 µm)

In der Zellkultur wurde auch die Expression von Integrin-Komplexen bestehend aus Integrin  $\beta_1$  und Integrin  $\alpha_2$  bzw.  $\alpha_3$  untersucht. Nach den Färbungen zeigte sich, dass Integrin  $\alpha_2\beta_1$  und Integrin  $\alpha_3\beta_1$  sowohl in Primärkulturen (Abbildung 4.10 und 4.11) als auch in den SV40 transfizierten Endothelzellen (Abbildung 4.12 und 4.13) gleichmäßig verteilt vorkommen.



Abbildung 4.10: Immuncytochemischer Nachweis von Integrin  $\alpha_2\beta_1$  in einer Primärkultur humaner kornealer Endothelzellen 7 Tage nach dem Umsetzen der Zellen. (Balkenlänge entspricht 50 µm)



**Abbildung 4.11:** Immuncytochemischer Nachweis von Integrin  $\alpha_3\beta_1$  in einer Primärkultur von Endothelzellen 7 Tage nach dem Umsetzen der Zellen. (Balkenlänge entspricht 50 µm)



Abbildung 4.12: Immuncytochemischer Nachweis von Integrin  $\alpha_2\beta_1$  in der SV40 transfizierten Endothelzelllinie. (Balkenlänge entspricht 50 µm)



Abbildung 4.13:Immuncytochemischer Nachweis von Integrin  $\alpha_3\beta_1$  in der SV40 transfizierten<br/>Endothelzelllinie. (Balkenlänge entspricht 50 µm)

Die Expression von Integrin  $\beta_1$  wurde auch nach Zelltransplantation untersucht. Kultivierte humane korneale Endothelzellen wurden auf Spenderhornhäute ohne eigenes Endothel transplantiert und anschließend drei Wochen lang in Organkultur kultiviert. Anschließend wurden von diesen Hornhäuten Querschnitte angefertigt und für immunhistochemische Färbungen verwendet. Dabei zeigte sich, dass die transplantierten Zellen eine ähnliche Färbung aufwiesen (Abbildung 4.14), wie sie schon bei Spenderhornhäuten mit eigenem Endothel beobachtet wurde (Abbildung 4.6 und 4.7)



Abbildung 4.14: Immunhistochemischer Nachweis von Integrin β<sub>1</sub> in SV40 transfizierten humanen kornealen Endothelzellen nach Transplantation dieser Zellen auf Spenderhornhäute. Auch hier erschienen alle Bereiche der Endothelzellen gefärbt. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

#### 4.4 Nachweis von ZO-1

Das Protein ZO-1 wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers im kornealen Endothel kultivierter Spenderhornhäute nachgewiesen. Da das Hornhautstroma durch das Färbeverfahren eintrübt und somit eine mikroskopische Auswertung erschwert wird, wurden vor Beginn der Färbungen die Descemet Membranen mitsamt dem Endothel von der Hornhaut abpräpariert. Nach Durchführung der immunhistochemischen Färbungen trat ein positives Signal zwischen den Endothelzellen an den Interzellulargrenzen auf (Abbildung 4.15).



Abbildung 4.15: Immunhistochemischer Nachweis von ZO-1 in kornealen Endothelzellen einer kultivierten Spenderhornhaut. Die Descemet Membran wurde vor der Färbung abgezogen. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hematoxillin durchgeführt, um die Zellkerne besser zu erkennen. Es ist zu sehen, dass das Protein ZO-1 in den interzellulären Verbindungen der Endothelzellen der Spenderhornhäute vorkommt. (Balkenlänge entspricht 50 μm) Expression von ZO-1 wurde auch während der Kultivierung humaner kornealer Endothelzellen untersucht. Nach den Färbungen zeigte sich, dass das Protein ZO-1 auch in Kulturen der SV40 transfizierten Endothelzelllinie in den interzellulären Verbindungen der Zellen nachweisbar war, jedoch erst, nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, d.h. 14 Tage nach dem Umsetzen der Zellen (Abbildung 4.16).



 Abbildung 4.16: Immuncytochemischer Nachweises von ZO-1 in einer Kultur der SV40 transfizierten Endothelzelllinie 14 Tage nach dem Umsetzen der Zellen. Es wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxilin durchgeführt, um die Zellkerne besser zu erkennen. Auch in der Zellkultur erscheint die Färbung wie bei dem Endothel der Spenderhornhäute vorwiegend an den Zellverbindungen. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

Die Expression von ZO-1 wurde auch nach Zelltransplantation untersucht. Kultivierte humane korneale Endothelzellen wurden auf Spenderhornhäute ohne eigenes Endothel transplantiert und anschließend drei Wochen lang in Organkultur konserviert. Anschließend wurden die Hornhäute für immunhistochemische Färbungen verwendet. Einerseits wurden die Zellen direkt auf den Hornhäuten gefärbt (Abbildung 4.17), da das Abziehen der Descemet Membran von den Hornhäuten mit transplantierten Endothelzellen zu einem vollständigen Ablösen der Zellen führte, andererseits wurden Querschnitte von Hornhäuten verwendet (Abbildung 4.18). In beiden Fällen zeigte sich, dass die transplantierten Zellen eine ähnliche Färbung aufwiesen wie sie schon bei Spenderhornhäuten mit eigenem Endothel beobachtet wurde.



Abbildung 4.17:Immunhistochemischer Nachweis von ZO-1 im Zellverband SV40 transfizierter<br/>humaner kornealer Endothelzellen nach Transplantation dieser Zellen auf<br/>Spenderhornhäute. Die Abbildung zeigt eine Aufsicht auf das neugebildete Endothel.<br/>Da das Abziehen der Descemet Membran von den Hornhäuten mit transplantierten<br/>Endothelzellen zu einem vollständigen Ablösen der Zellen führte, wurden die Zellen<br/>auf den Hornhäuten gefärbt. Aufgrund der Trübung des Hornhautstromas im Laufe<br/>der immunhistochemischen Färbung ist das Endothel nur sehr verschwommen<br/>darstellbar. Dennoch ist zu erkennen, dass die Färbung vorwiegend in dem<br/>interzellulären Bereich auftrat.<br/>(Balkenlänge entspricht 50 μm)



Abbildung 4.18:Immunhistochemischer Nachweis von ZO-1 in SV40 transfizierten humanen<br/>kornealen Endothelzellen nach Transplantation dieser Zellen auf Spender-<br/>hornhäute. Die Färbung wurde an einem Kryoschnitt durchgeführt. Die teilweise<br/>Ablösung der Zellen von der Descemet Membran geht auf den Färbevorgang<br/>zurück.

(Balkenlänge entspricht 50 µm)

#### 4.5 Färbungen mit dem Antikörper 9.3.E

Der gegen humane korneale Endothelzellen gerichtete monoklonale Antikörper 9.3.E wurde von Engelmann etabliert. Dieser Antikörper bindet an humane kultivierte Endothelzellen in situ sowie in der Zellkultur und zwar an ein 130 kDa Protein, (Foets et al. 1992, Engelmann et al., 2001). Um die Verteilung dieses nicht näher charakterisierten Proteins innerhalb des Zellverbandes zu untersuchen, wurden isolierte Descemet Membranen mitsamt Endothel immunhistochemisch unter Verwendung des Antikörpers 9.3.E. untersucht (Abbildung 4.19). Außerdem wurden Querschnitte von Spenderhornhäuten für derartige Färbungen verwendet, um den Bereich der Anheftung der Endothelzellen an die Descemet Membran zu untersuchen (Abbildung 4.20). Nach den Färbungen zeigte sich, dass dieses Protein in allen Zellen des Endothelverbandes vorkommt. Auch auf den Querschnitten erschienen alle Endothelzellen gefärbt.



 Abbildung 4.19: Immunhistochemische F\u00e4rbung der kornealer Endothelzellen einer kultivierter Spenderhornhaut mit dem Antik\u00f6rper 9.3.E. Die Descemet Membran wurde vor der F\u00e4rbung abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind. Es ist zu sehen, dass alle Endothelzellen eine F\u00e4rbung aufweisen. (Balkenl\u00e4nge entspricht 50 µm)



Abbildung 4.20: Immunhistochemische Färbung der kornealer Endothelzellen in einem Querschnitt einer kultivierter Spenderhornhaut mit dem Antikörper 9.3.E. Es ist zu sehen, dass alle Endothelzellen gefärbt sind. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

Expression dieses Proteins wurde auch während der Kultivierung humaner kornealer Endothelzellen untersucht. Nach den Färbungen zeigte sich, dass dieses Protein sowohl in allen Zellen sowohl der Primärkulturen als auch der SV40 transfizierten Endothelzelllinie vorkommt. Expression dieses Proteins wurde sowohl vier Tage nach dem Umsetzen der Zellen, also während der exponentiellen Wachstumsphase (Abbildung 4.21) als auch 14 Tage nach dem Umsetzen, also nach Ausbildung eines konfluenten Zelllayers nachgewiesen (Abbildung 4.22). In den konfluenten Zellen erschien die Färbung in den interzellulären Bereichen intensiver.



Abbildung 4.21: Immuncytochemische F\u00e4rbung mit dem Antik\u00f6rper 9.3.E. Sowohl in der Prim\u00e4rkultur humaner kornealer Endothezellen als auch in der Kultur der SV40 transfizierten Endothelzelllinie wiesen alle Zellen eine deutliche F\u00e4rbung auf. Die F\u00e4rbungen wurden 4 Tage nach dem Umsetzen der Zellen, also innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase durchgef\u00fchrt.
 (Balkenl\u00e4nge entspricht 50 \u00e4m)



Abbildung 4.22: Immuncytochemischer Färbung mit dem Antikörper 9.3.E durchgeführt in einer Primärkultur humaner kornealer Endothezellen und in einer SV40 transfizierten Endothelzelllinie 14 Tage nach dem Umsetzen der Zellen. Es ist zu sehen, dass auch nach Ausbildung eines konfluenten Zelllayers alle Zellen eine Färbung aufwiesen In den konfluenten Bereichen erschien die Färbung in dem interzellulären Bereich intensiver.

(Balkenlänge entspricht 50 µm)

Auch Querschnitte von Spenderhornhäuten mit transplantierten Zellen wurden mit dem Antikörper 9.3.E immunologisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die transplantierten Zellen eine ähnliche Färbung aufwiesen (Abbildung 4.23), wie sie schon bei Spenderhornhäuten mit eigenem Endothel beobachtet wurde.



Abbildung 4.23: Immunhistochemische F\u00e4rbung mit dem Antik\u00f6rper 9.3.E von transfizierten humanen kornealen Endothelzellen nach Transplantation dieser Zellen auf Spenderhornh\u00e4ute. Auch hier erschienen alle Endothelzellen gef\u00e4rbt. (Balkenl\u00e4nge entspricht 50 μm)

#### 4.6 Nachweis der Zellproliferation und Kontaktinhibition

Die Proliferation der SV40 transfizierten kornealen Endothelzellen wurde auf zwei unabhängige Arten untersucht. Zum einen durch den immuncytochemischen Nachweis des Einbaus des Thymidin Analogons BrdU in neu synthetisierte DNS. Zum anderen durch den immuncytochemische Nachweis der Expression von Ki67, einem Protein, das mit der Zellproliferation assoziiert ist. Färbungen wurden 4 Tage nach dem Umsetzen der Zellen, also während der exponentiellen Wachstumsphase, sowie 14 Tage nach dem Umsetzen der Zellen, also nach Ausbildung eines konfluenten Zellayers, durchgeführt. Bezüglich des Einbaus von BrdU in neusynthetisierte DNS ergab sich folgendes Ergebnis. Nach Zugabe von BrdU zum Kulturmedium subkonfluenter Kulturen wies nach der anschließenden immuncytochemischen Färbung die Mehrzahl der Zellen eine deutliche Färbung des Zellkernes auf (Abbildung 4.24a). Diese Proliferationsaktivität hielt auch noch bei Erreichen der Konfluenz an. Wurden hingegen Kulturen untersucht, die schon einige Tage zuvor Konfluenz erreicht hatten, so führte eine gleichlange Inkubation mit BrdU nur in wenigen Zellen zu einem Einbau in die DNS (Abbildung 4.24b). Diese Kulturen waren nicht nur gekennzeichnet durch eine vollständige Bedeckung der Kulturschalenoberfläche mit Zellen, sondern auch durch eine deutlich geringere Zellgröße als in subkonfluenten Kulturen oder Kulturen, die kurz zuvor Konfluenz erreicht hatten.



Abbildung 4 24:Einbau von BrdU in subkonfluente (a) und konfluente (b) Kulturen SV40 transfizierter<br/>humaner kornealer Endothelzellen. Dem Medium der Kulturen wurde am 3 Tag (a)<br/>bzw. am 13 Tag (b) nach Aussaat der Zellen BrdU zugefügt. Nach weiteren 36 h<br/>wurden die Zellen fixiert und der Einbau von BrdU mit Hilfe eines monoklonalen<br/>Antikörpers nachgewiesen. Während der größte Teil der Zellkerne der subkonfluenten<br/>Kultur (a) eine Färbung aufwies, wurden in der konfluenten Kultur (b) nur vereinzelt<br/>gefärbte Zellkerne beobachtet. Einige gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert.<br/>(Balkenlänge entspricht 100 μm).

Ein vergleichbares Ergebnis wurde beim Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 in den kultivierten SV40-transfizierten humanen kornealen Endothelzellen gefunden. Auch bei diesen Untersuchungen wiesen fast alle Zellkerne der subkonfluenten Kulturen eine Färbung auf (Abbildung 4.25a) während in den konfluenten Kultur nur vereinzelt gefärbte Zellkerne beobachtet (Abbildung 4.25b)



Abbildung 4.25: Expression von Ki67 in subkonfluenten (a) und konfluenten (b) Kulturen humaner kornealer Endothelzellen. Während fast alle Zellkerne subkonfluenter Kulturen (a) eine Färbung aufwiesen, wurden in konfluenten Kulturen (b) nur vereinzelt gefärbte Zellkerne beobachtet. Einige gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert. (Balkenlänge entspricht 100 μm).

#### 4.7 Proliferation humaner kornealer Endothelzellen in situ

Die Proliferation humaner kornealer Endothelzellen wurde nicht nur in der Zellkultur, sondern auch in situ untersucht, das heißt in humanen kornealen Endothelzellen, die sich noch auf ihrer ursprünglichen Descemet Membran befanden. Es wurden, wie bei den kultivierten Zellen, sowohl der Einbau des Thymidin Analogons 5-Bromo-2'- deoxy-uridin in neu synthetisierten DNS als auch die Expression des mit der Proliferation assoziierten Proteins Ki67 untersucht. Wie im Kapitel 3.5 beschrieben, wurden sowohl Skleralringe als auch ganze Spenderhornhäute, die nicht für eine Keratoplastik geeignet waren, verwendet. Die Descemet Membranen wurden vor den Färbungen abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind.

Zunächst wurde das noch verbliebene Endothel von 4 Skleralringen auf den Einbau von BrdU untersucht. Dabei zeigte sich, dass in allen vier Präparaten ein Einbau von BrdU in korneale Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Tabelle 4.1, Abbildung 4.26). Die positiven Zellen waren innerhalb des Endothels ungleichmäßig verteilt. Außerdem konnte die Descemet Membran nicht immer vollständig gewonnen werden, so dass eine prozentuale Angabe der proliferierenden Zellen nicht möglich war.

Skleralring	Kulturdauer	BrdU-	Spender-	Pm-Zeit	Endotzhelzelldichte	
Nr.	vor OP	positive	alter	[h]	vor OP	
	[Tage]	Zellen	[Jahre]		[Zellen / mm2]	
1	14	ja	82	20	2100	
2	15	ja	82	22	2400	
3	16	ja	57		2200	
4	20	ja	82	22	2200	

Tabelle 4.1: Einbau von BrdU in korneale Endothelzellen von Skleralringen. Es wurden vier Skleralringe<br/>von Spenderhornhäuten untersucht, die vor der Verwendung zur Transplantation zwischen<br/>14 und 20 Tage kultiviert worden waren. Im Endothel aller vier Skleralringe konnten Zellen<br/>nachgewiesen werden, in denen während der Inkubationszeit mit BrdU ein Einbau von BrdU<br/>in neusynthetisierte DNS stattgefunden hatte.



Abbildung 4.26:Nachweis der Zellproliferation durch den Einbau von BrdU in humane korneale<br/>Endothelzellen eines Skleralringes. Die Descemet Membran wurde vor den Färbungen<br/>abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind. Einige gefärbte Zellkerne<br/>sind durch Pfeile markiert (Balkenlänge entspricht 50 μm).

Bei der Analyse der Expression von Ki67 in Endothelzellen von Skleralringen ergab sich ein analoges Ergebnisse. Auch hier konnten im Endothel aller vier untersuchten Skleralringe positive Zellen nachgewiesen werden (Tabelle 4.2, Abbildung 4.27). Die Verteilung dieser positiven Zellen innerhalb des Endothels war ebenfalls nicht einheitlich.

Skleralring	Kulturdauer	Ki67 positive	Spender-	Pm-	Endothelzelldichte	
Nr.	vor OP	Zellen	alter	Zeit	vor OP	
	[Tage]		[Jahre]	[h]	[Zellen / mm <sup>2</sup> ]	
5	8	ja	70		2000	
6	7	ja	65	62	2600	
7	8	ja	73	66	2400	
8	9	ja	58	61	2300	

 Tabelle 4.2: Expression des Proliferation-assozierten Proteins Ki 67 in Endothelzellen von Skleralringen.

 In allen vier untersuchten Skleralringen wurden immuncytochemisch korneale Endothelzellen nachgewiesen, die das Protein Ki67 exprimierten.



Abbildung 4.27: Expression von Ki67 in einem Skleralring. Die Descemet Membran wurde vor den Färbungen abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind. . Einige gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert (Balkenlänge entspricht 50 μm).

Auch bei der Analyse des Endothels von Spenderhornhäuten, die nicht für eine Keratoplastik geeignet waren, wurden in 10 von 12 untersuchten Hornhäuten im Randbereich des Endothels Zellen nachgewiesen, die BrdU in neusynthetisierte DNS eingebaut hatten (Tabelle 4.3). Im Endothel des Zentrums der Hornhäute wurde jedoch in keinem Fall ein Einbau von BrdU gefunden (Tabelle 4.3). Auch bei dieser Untersuchung waren die positiven Zellen nicht gleichmäßig im Endothel der Hornhäute verteilt (Abbildung 4.28 und 4.29).

HH-Nr.	Kulturdauer	Positive Zellen in der			Spenderalter	Pm-Zeit
	[Tage]	ÄP MP Z		[Jahre]	[h]	
1	7	+	-	-	86	21
2	5	+	-	-	62	44
3	30	-	-	-	80	85
4	23	-	-	-	67	47
5	15	+	+	-	62	2
6	27	+	-	-	76	22
7	26	+	-	-	62	23
8	12	+	+	-	82	23
9	29	+	*	-	76	64
10	5	+	-	-	88	99
11	12	-	+	*	82	23
12	6	*	+	*	71	180

Tabelle 4.3: Untersuchungen zur Proliferation humaner kornealer Endothelzellen in Abhängigkeit von deren Position auf der Spenderhornhaut durch den Nachweis des Einbaus von BrdU. Die Descemet Membranen von 12 Spenderhornhäute wurden vor der Inkubation mit BrdU mit Trepanen von 6,5 und 9,0 Millimeter Ø in drei Zonen unterteilt: äußere Peripherie (ÄP), mittlere Peripherie (MP) und Zentrum (Z). Bei keiner der untersuchten Hornhäute wurden angefärbte Zellen im Zentrum der Hornhaut (Zone bis zu einer Entfernung von 6,5 mm vom Hornhautmittelpunkt) gefunden (-). In 4 Hornhäuten wurden in der mittleren Peripherie (Zone zwischen 6,5 und 9,0 mm vom Hornhautmittelpunkt) und in 8 Hornhäute in der äußeren Peripherie (Entfernung größer als 9,0 mm vom Hornhautmittelpunkt) positive Zellen nachgewiesen (+). In zwei Hornhäuten (Hornhäute 3 und 4) konnten keine positiven Zellen nachgewiesen werden. Von einigen Zonen konnten keine Descemet Membranen mit Endothelzellen isoliert werden (\*).



Abbildung 4.28:Nachweis des Einbaus von BrdU in Endothelzellen der mittlere Peripherie (Zone zwischen 6,5<br/>und 9,0 mm vom Zentrum der Hornhaut) von zwei Spenderhornhäute Die Descemet Membranen<br/>wurden vor den Färbungen abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind. In einigen<br/>Fällen waren zahlreiche proliferierende Zellen (a) und in anderen Fällen nur vereinzelt<br/>proliferierende Zellen zu sehen. Einige gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert.<br/>(Balkenlänge entspricht 50 μm)



Abbildung 4.29:Nachweis der Zellproliferation durch den Einbau von BrdU in korneale Endothelzellen<br/>der äußeren Peripherie von zwei Spenderhornhäute .Die Descemet Membranen wurden<br/>vor den Färbungen abgezogen, damit die Endothelzellen besser sichtbar sind. Einige<br/>gefärbte Zellkerne sind durch Pfeile markiert. (Balkenlänge entspricht 50 μm)

#### **Diskussion**

In Deutschland werden jährlich etwa 4000 Keratoplastiken durchgeführt, wobei die Tendenz steigend ist (Sundmacher und Reinhard 2001). Daraus resultiert eine erhöhte Nachfrage an Spenderhornhäuten. Schon vor Jahrzehnten wurden die ersten Hornhautbanken gegründet, um eine ausreichende Versorgung der Patienten mit Spenderhornhäuten zu gewährleisten (Paton 1968). In Hamburg wurde 1982 eine Hornhautbank eingerichtet in der die zuvor übliche Konservierung bei 4°C durch die Langzeitkultivierung bei 37°C ersetzt wurde (Böhnke 1991; Engelmann et al. 1992). Heute ist die Langzeitkultivierung in Europa die bevorzugte Kultivierungsmethode für Spenderhornhäute (Directory of the European Eye Bank Association). Vor der Transplantation von Spenderhornhäuten wird sichergestellt, dass diese den von der European Eye Bank Association bzw. Der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Hornhautbanken vorgeschriebenen Qualitätsanforderungen genügen (Richtlinien zum Führen einer Hornhautbank 2000). Zu diesen Qualitätsanforderungen zählt unter anderem die Anwesenheit einer geschlossenen Endothelschicht mit einer Zelldichte von mindestens 2000 Zellen pro mm<sup>2</sup>. Gerade dieses Kriterium wird von etwa 30% der Hornhäute nicht erfüllt, so dass sie wegen zu geringer Endothelzelldichte nicht zur Keratoplastik freigegeben werden. Die bisherigen Versuche, die Endothelzelldichte von Spenderhornhäuten während der Kultivierung durch Zugabe von Wachstumsfaktoren zu erhöhen, waren nicht erfolgreich (Schultz 1992; Barisani-Asenbauer 1997).

An der Hornhautbank Hamburg wurde daher ein Verfahren entwickelt, mit dem kultivierte korneale Endothelzellen auf Spenderhornhäute mit zu geringer Endothelzelldichte transplantiert werden können (Engelmann et al. 1993, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit sollten Informationen zur Anheftung der transplantierten Zellen an die Descemet Membran, zur Kontaktinhibition nach Ausbildung eines Monolayers und zur Ausbildung interzellulärer Kontakte gewonnen werden.

Für die Zellanheftung stellen Integrine die wichtigste Klasse von Molekülen dar. Sie fördern sowohl die Anheftung der Zellen an die extrazelluläre Matrix als auch die Ausbildung interzellulärer Verbindungen und sind darüber hinaus als Rezeptoren an der Signalübertragung beteiligt (Hynes 1992; Ruoslahti 1996). Integrin  $\beta_1$  bildet mit verschiedenen Integrinen vom Typ alpha Komplexe, die Rezeptoren für Kollagen, Laminin oder Fibronektin darstellen. So kann Integrin  $\alpha_2\beta_1$  sowohl an Kollagen als auch an Laminin binden (Languino et al. 1989; Elices u. Hemler 1989). Kollagene, Fibronektin und Laminin sind Bestandteile der extrazellulären Matrix humaner kornealer Endothelzellen. Auch Integrin  $\alpha_3\beta_1$  stellt einen Laminin-Rezeptor dar (Gehlsen et al. 1989, 1992) dessen Beteiligung an der Anheftung von immortalisierten kornealen Epithelzellen nachgewiesen wurde (Filenius et al. 2001).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Integrinkomplexe  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_3\beta_1$  auch in den transfizierten humanen kornealen Endothelzellen exprimiert werden. Eine Beteiligung dieser Rezeptoren könnte die schnelle Anheftung erklären, die nach Transplantation dieser Zellen auf Spenderhornhäute beschrieben wurde (Aboalchamat et al. 1999). Eine Beteiligung dieser Integrinkomplexe an der Anheftung humaner kornealer Endothelzellen wurde weiterhin durch den Nachweis von Integrin  $\beta_1$  in den transplantierten kornealen Endothelzellen sowie in den Endothelzellen normaler Spenderhornhäute unterstützt. Dennoch ist die Anheftung der transplantierten kornealen Endothelzellen auch vier Wochen nach der Transplantation nicht so fest, wie bei normalen kornealen Endothelzellen. Dies zeigte sich darin, dass bei normalen Spenderhornhäuten die Descemet Membran mechanisch vom Stroma entfernt werden konnte, ohne dass es zu einer vollständigen Ablösung der Endothelzellen kam. Bei Spenderhornhäuten mit transplantierten kornealen Endothelzellen führte die mechanische Ablösung der Descemet Membran immer auch zu einem vollständigen Ablösen der Endothelzellen von der Descemet Membran.

Neben einer verringerten Anheftung der Zellen an die Descemet Membran können auch fehlende oder nur in geringerem Ausmaß ausgeprägte interzelluläre Verbindungen für den vollständigen Verlust der Endothelzellen beim mechanischen Abpräparieren der Descemet Membran mit verantwortlich sein.

Die wichtigsten interzellulären Kontakte des kornealen Endothels sind tight junctions, die als charakteristische Komponente das Protein ZO-1 enthalten (Joyce et al. 1998; Petroll et al. 2001). Diese Kontakte dienen als Barriere gegen die Passage von Stoffen durch die Interzellularspalten. Wie die Untersuchungen dieser Arbeiten gezeigt haben, ist dieses Protein auch in der SV40 transfizierten Endothelzelllinie nachweisbar. Die Beobachtungen, dass dieses Protein nur von Zellen konfluenter Kulturen gebildet wurde und nur in Bereichen benachbarter Zellen nachweisbar war, deuten auf die Bildung von tight junctions hin. Der Nachweis kompletter tight junctions kann jedoch nur durch die im Anschluss an diese Arbeit geplanten elektronenmikroskopischen Untersuchungen erbracht werden. Die Ausbildung von tight junctions scheint auch nach der Transplantation kultivierter kornealer Endothelzellen auf Spenderhornhäute zu erfolgen, da auch in dem von den transplantierten Endothelzellen gebildetem, geschlossenem Endothel das Protein ZO-1 nachweisbar war. Das nach immunhistochemischer Färbung auftretende Muster entsprach demjenigen, das im Rahmen dieser Arbeit auch an humanen Spenderhornhäuten gefunden wurde und das auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden ist (Senoo et al. 2000). Aber auch in diesem Fall ist ein eindeutiger Nachweis nur durch elektronenmikroskopische Untersuchungen möglich.

Neben der Ausbildung von tight junctions ist eine starke Kontaktinhibition ein typisches Merkmal für korneale Endothelzellen. Zellteilungen innerhalb des Endothels humaner Hornhäute wurden nur gelegentlich und als seltenes Ereignis beschrieben (Treffers 1982; Laing et al. 1984; Couch et al. 1987). Selbst im Falle von Wundheilungen wird die zur Verfügung stehende Oberfläche bevorzugt durch Zellvergrößerungen als durch Zellteilungen bedeckt, wobei interzelluläre Kontakte erhalten bleiben (Petroll et al. 2001). Diese starke Kontaktinhibition mag auch dafür verantwortlich sein, dass bei vorangegangenen Versuchen zur Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen nur Zelldichten von unter 2000 Zellen/mm<sup>2</sup> erreicht wurden (Engelmann et al. 1993, 1999). Auch in einer neueren Studie, bei der humane korneale Endothelzellen aus Primärkulturen oder der ersten Passage zur Transplantation verwendet wurden, erreichte die Zelldichte des neu gebildeten Endothels nur 1500 bis 2100 Zellen pro mm<sup>2</sup> (Chen et al. 2001). Zellen höherer Passagen wurden in dieser Arbeit nicht zur Transplantation verwendet, da diese schon in der Zellkultur deutlich geringere Zelldichten aufwiesen. Die Tendenz der humanen kornealen Endothelzellen, die zur Verfügung stehende Oberfläche vorwiegend durch Größenzunahme und nicht durch Zellteilungen zu bedecken, wurde auch in Wundheilungsstudien beobachtet (Treffers 1982; Petroll et al. 2001).

Bei den SV40-transfizierten humanen kornealen Endothelzellen scheint dagegen die Proliferationsaktivität gegenüber der Tendenz zur Größenzunahme zu überwiegen. Daher wurden in den konfluenten Kulturen Zelldichten bis zu 4000 Zellen pro mm<sup>2</sup> gemessen. Erst nach mehrtägiger Konfluenz und nach Erreichen dieser hohen Endothelzelldichte nahm die Proliferation. wahrscheinlich aufgrund der Kontaktinhibition, ab. Dies erklärt auch, warum bei vorangegangenen Transplantationsversuchen mit den SV40-transfizierten kornealen Endothelzellen deutlich höhere Endothelzelldichten erreicht wurden als mit normalen kornealen Endothelzellen (Aboalchamat et al. 1999). Leider war es mit den zur Verfügung stehenden Mitteln nicht möglich, diese Kontaktinhibition nach Zelltransplantation direkt nachzuweisen. Eine immunhistochemische Färbung der transplantierten Zellen auf der Spenderhornhaut führte zu einer Eintrübung des Hornhautstromas, so dass eine anschließende mikroskopische Untersuchung keine eindeutigen Ergebnisse brachte. Wie schon oben erwähnt, kam es beim Abziehen der Descemet Membran vor oder im Anschluss an eine immunhistochemische Färbung regelmäßig zum Ablösen der transplantierten Zellen von der Descemet Membran.

Die bisherigen Ergebnisse zur Transplantation humaner kornealer Endothelzellen haben ergeben, dass das Erreichen einer hohen Zelldichte nach Transplantation von der Verwendung proliferationsfähiger Zellen abhängt. Eine frühere Beobachtung hatte gezeigt, dass nur die aus dem Randbereich humaner Spenderhornhäute isolierten Endothelzellen in vitro Proliferation aufwiesen, nicht jedoch die Endothelzellen aus dem Zentrum humaner Spenderhornhäute (Bednarz et al. 1998). Nach Transplantation auf Endothelzell-freie Spenderhornhäute reagierten die aus dem Zentrum isolierten Endothelzellen mit Zellvergrößerung, wiesen aber keine Anzeichen von Proliferation auf, während die aus der Peripherie isolierten Endothelzellen deutlich kleiner waren und Anzeichen von Proliferation zu erkennen waren (Bednarz et al. 1997). Die Ursache für diesen Unterschied im Proliferationsverhalten ist noch ungeklärt. Darüber hinaus konnte dieser Unterschied bisher nur nach Isolierung der Zellen beobachtet werden. Solange die Endothelzellen auf der Descemet Membran verankert waren, war auch in der Hornhautperipherie keine Proliferationsaktivität im Endothel zu beobachten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zumindest in einem Teil der peripheren Endothelzellen Proliferation induzierbar, oder die Kontaktinhibition unterdrückbar ist, ohne dass die Zellen wie bei vorangegangenen Untersuchungen von der Descemet Membran abgelöst werden müssen. Der zugrunde liegende Mechanismus bleibt jedoch nach wie vor ungeklärt und ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen die schon früher geäußerte Hypothese, nach der im Randbereich humaner Hornhäute Vorläuferzellen für das korneale Endothel existieren (Bednarz et al. 1998). Ziel ist es, derartige Vorläuferzellen zu isolieren, kultivieren und aufzureinigen. Diese Zellfraktion könnte möglicherweise eine deutlich höhere Proliferationsaktivität aufweisen als die bisher etablierten Kulturen humaner kornealer Endothelzellen, die nach der oben genannten Hypothese eine Mischung aus Vorläuferzellen und ausdifferenzierten, nicht mehr proliferierenden Zellen enthalten.

Wie die Transplantationsversuche mit SV40 transformierten humanen kornealen Endothelzellen gezeigt haben, lässt eine erhöhte Proliferationsaktivität auch eine höhere Zelldichte nach Transplantation auf Spenderhornhäute erwarten. Damit besteht in Zukunft vielleicht die Möglichkeit, Hornhauttransplantate mit unzureichendem Endothel durch Transplantation von kultivierten humanen kornealen Endothelzelln mit einem Endothel hoher Zelldichte auszustatten und die Hornhäute dadurch für Transplantationszwecke nutzbar zu machen. Dies würde zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der zur Verfügung stehenden Hornhauttransplantate führen und damit zu einer Verbesserung der Patientenversorgung beitragen.

#### 6. Zusammenfassung

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Transplantation kultivierter humaner kornealer Endothelzellen auf Spenderhornhäute zur Ausbildung eines neuen Endothels führt. In Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Anheftung, zur Kontaktinhibition und zur Ausbildung intrazellulärer Kontakte sowohl in den kultivierten als auch in den transplantierten Zellen durchgeführt. Bezüglich der Zellanheftung deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die Bindung der transplantierten Zellen an die Descemet Membran der Spenderhornhäute durch Integrinkomplexe unter Beteiligung von Integrin  $\beta_1$  vermittelt wird. Als Marker für die Ausbildung interzellulärer Kontakte wurde die Expression des Proteins ZO-1, einer charakteristischen Komponente der tight junctions untersucht. Dieses Protein wurde sowohl in konfluenten Zellkulturen, aber auch in dem neu gebildeten Endothel nach Transplantation der kultivierten Endothelzellen auf Spenderhornhäute nachgewiesen. Die Verteilung dieses Proteins entsprach dabei derjenigen im Endothel normaler Spenderhornhäute.

Ein weiteres Merkmal kornealer Endothelzellen ist ihre starke Kontaktinhibition. Diese Kontaktinhibition ist die Ursache dafür, dass im Endothel humaner Hornhäute keine oder kaum Zellproliferation nachweisbar ist. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Kontaktinhibition selbst in den stark proliferierenden SV40 transfizierten kornealen Endothelzellen auftritt. Ferner konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass in einigen Endothelzellen der Hornhautperipherie diese Kontaktinhibition nach Trepanation des Hornhautzentrums aufgehoben ist und diese Zellen zu proliferieren beginnen, obwohl sie sich noch im dichten Zellverband befinden. Die Ursache für die Aufhebung der Kontaktinhibition bzw. der Induktion der Proliferation bleiben vorerst ungeklärt. Das Ergebnis unterstützt bereits früher geäußerte Vermutungen, dass in der Hornhautperipherie Vorläuferzellen für das korneale Endothel lokalisiert sind. Die Isolierung und Kultivierung derartiger Vorläuferzellen eröffnet auf längere Sicht eventuell die Möglichkeit, Zellmaterial zur Transplantation kornealer Endothelzellen auf Spenderhornhäute zur Verfügung zu haben, dass die Ausbildung eines Endothels hoher Zelldichte gewährleistet. Dies würde erheblich dazu beitragen, den bestehenden Mangel an Hornhauttransplantaten zu reduzieren und die Patientenversorgung in diesem Bereich zu verbessern.

#### 7. Literatur

#### Aboalchamat B, Engelmann K, Böhnke M, Eggli P, Bednarz J (1999)

Morphological and functional analysis of immortalized human corneal endothelial cells after transplantation. *Exp. Eye Res.* 69, 547-553

Alvarado A, Gospodorovicz D and Greenburg G (1981)

Corneal endothelial replacement Invest. Ophtalmol. Vis. Sic. 21, 300-316

# Barisani-Asenbauer T, Kaminski S, Schuster E, Dietrich A, Biowski R, Lukas J, Gosch-Baumgartner I (1997)

Impact of growth factors on morphometric corneal endothelial cell parameters and cell density in culture-preserved human corneas *Cornea 16, 537-540* 

#### Bednarz J, Richard G, Böhnke M, Engelmann K (1997)

Differences in proliferation and migration of corneal endothelial cells after cell transplantation in vitro *Germ. J. Ophthalmol. 5, 346-351* 

#### Bednarz J, Rodokanaki-von Schrenck A, Engelmann K (1998)

Different charasteristics of endothelial cells from central and peripheral human cornea in primary culture and after subculture *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal 34,149-153* 

#### Bednarz J, Teifel M, Friedl P, Engelmann K (2000)

Immortalization of human corneal endothelial cells using electroporation protocol optimized for human corneal endothelial and human retinal pigment epithelial cells *Acta Ophthalmol. Scand. 130-136* 

#### **Bigger SL (1837)**

zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: corneal transplantation. Blackwell Scientific Publications, Oxford,(1966) p. 1

#### Böhnke M (1991)

Spendergewebe für die Keratoplastik Klin. Mbl. Augenheilk. 198, 562-571

#### Bourne WM (1976)

Examination and photography of donor corneal endothelium *Arch. Ophthalmol. 94, 1799-1800* 

#### Chen K, Azar D, Joyce N (2001)

Transplantation of adult human corneal endothelium ex vivo *Cornea 20, 731-737* 

#### Couch JM, Cullen P, Casey TA, Fabre JW (1987)

Mitotic activity of corneal endothelial cells in organ culture with recombinant human epidermal growth factor *Ophthalmol. 94,1-6* 

#### **Darwin E (1797)**

zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: corneal transplantation. Blackwell Scientific Publications, Oxford,(1966) p. 1

#### Dieffenbach JF (1831)

Beiträge zur Verpflanzung der Hornhaut. Zeitschrift für die Ophthalmol 1, 172-176

#### Dikstein S, Maurice DM (1972)

The metabolic basis to the fluid pumps in the cornea *J. Physio.l 221, 29-41* 

#### Eggli P, Boulton M, Marschall J (1989)

Growth characteristics of central and peripheral bovine corneal epithelial cells in vitro *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 227, 263-270

#### Elices MJ, Hemler ME (1989)

The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cell and a collagen/laminin receptor on others *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9906-9910* 

# Engelmann K, Hagenah M, Püschel K, Lockemann U, Kühnl P, Sibrowski W, Laufs R, Böhnke M, Draeger J, Winter R (1992) Struktur, Organisation und Leistungen der Hornhautbank Hamburg

Hamburger Ärzteblatt 46, 390-396

#### Engelmann K, Drexler D, Draeger J, Böhnke M (1993)

Endothelzelltransplantation im Modell Ophthalmologe 90, 166-170

#### Engelmann K, Drexler D, Böhnke M (1999a)

Transplantation of adult human and porcine endothelial cells onto human corneas in vitro Part I: Cell culturing and transplantation procedure *Cornea 18, 199-206* 

#### Engelmann K, Bednarz J, Draeger J, Böhnke M (1999b)

Die Endothelzelltransplantation und das Wachstumsverhalten des Humanen kornealen Endothels *Ophthalmologe 96, 555-56* 

#### Engelmann K, Bednarz J, Schäfer J and Friedl P (2001)

Isolation and charactrization of a mouse monoclonal antibody against human corneal endothelial cells *Exp. Eye Res.* 73, 9-16

#### **European Eye Bank Association Directory**

10th Edition, Paris, France, January 2002

# Filenius S, Hormia M, Rissanen J, Burgeson RE, Yamada Y, Araki-Sasaki K, Nakamura M (2001)

Laminin synthesis and the adhesion characteristics of immortalized human corneal epithelial cells to laminin isoforms *Exp-Eye-Res* 72, 93-103

#### Gehlsen KR, Dickerson K, Argraves WS, Engvall E, Ruoslahti E (1989)

Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site laminin

J. Biol. Chem. 264, 19034-19038

#### Gehlsen KR, Sriramarao P, Furcht LT, Skubitz AP (1992)

A synthetic peptide derived from the carboxy terminus of the laminin A chain represents a binding site for the alpha 3 beta 1 integrin *J. Cell Biol. 117, 449-459* 

#### Gerosky DH, Matsuda M, Yee RW, Edelhauser HF (1985)

Pump function of the human corneal endothelium *Ophthalmol.* 92, 759-763

#### Gospodorovicz D and Greenburg G (1979)

The Coating of Bovine and Rabbit Corneas Denuded of Their Endothelium with Bovine Corneal Endothelial Cells *Exp. Eye Res.* 28, 249-256

#### Hempel B, Bednarz J, Engelmann K (2001)

Use of e serum-free medium for a long-term storage of human corneas. Influence on endothelial cell density and corneal metabolism *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 239, 801-805* 

Himly K (1813)

zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: corneal transplantation.

Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966: p. 1

#### Hirsch M, Renard G, Faure JP, Pouliquen Y (1977)

Study of ultrastructure of the rabbit corneal endothelium by the freeze-fracture Technique *Exp. Eye Res. 25, 277-288* 

#### Hynes RO (1987)

Integrins: a family of cell surface receptors *Cell 48, 549-554* 

#### Hynes RO (1992)

Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion *Cell* 69, 11-25

#### Iwamoto T, Smelser GK (1965)

Electron microscopy of the human corneal endothelium with reference to transport mechanisms *Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 4, 270-283* 

#### Joyce NC, Harris DL, Zieske JD (1998)

Mitotic inhibition of corneal endothelium in neonatal rats Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 39,2572-2583

#### Kapoor R, Sakai L, Funk S, Roux E (1988)

Type Viii collagen has a restricted distribution in specialized extracellular matrices *J. Cell Biol.* 107, 721-730

#### Kissam RS (1844)

NY J Med 2:281. Zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: corneal transplantation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966: p. 1

#### Kenney MC, Hinds D, Waring GO (1982)

Localization of fibronectin and fibrogen/fibrinin Descemet's membrane from normal, Fuchs'endothelial dystrophy and keratokonos corneas *ARVO abstracts, Invest. Ophtalmol. Vis. Sic. 22, 27* 

#### Klyce SD, Beuermann RW (1988)

Structure and function of the cornea The Cornea (Kaufmann HE, Barron BA, McDonalb MB, Waltmann SR), Churchill Livingstone, New York 3-54

#### Kreutziger GO (1976)

Lateral Membrane morphology and gap junction structure in rabbit corneal endothelium *Exp. Eye Res. 23, 285-293* 

#### Laing RA, Sandstrom MM; Berrospi AR (1976)

Changes in the corneal endothelium as a function of age *Exp. Eye Res. 22, 587-594* 

#### Laing RA, Neubauer L, Oak SS, Kayne HL, Leibowitz HM (1984)

Evidence for mitosis in the adult corneal endothelium *Ophthalmol. 91,1129-1134* 

#### Languino LR, Gehlsen KR, Wayner E, Carter WG, Engvall E, Ruoslahti E (1989)

Endothelial cells use alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor J Cell Biol. 109, 2455-2462

#### Laule A, Cable MK, Hoffmann CE, Hanna C (1978)

Endozhelial cell population changes of human cornea during life *Arch. Ophthalmol. 96, 2031-2035* 

#### Levy S, Moss J, Sawada H, Dopping-Hepenstal P, McCartney A (1995)

The composition of wide-spaced collagen in normal and diseased descemet's membrane *Current Eye Research 45-52* 

#### Lütjen -Drecoll E,Lönnerholm G (1981)

Carbonic anhydrase distribution in the rabbit eye by light and electron microscopy *Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 21, 782-791* 

#### Matsuda M, Ubels JL, Edelhauser HF (1986)

Kinetics of corneal wound healing Corneal Surgury 603-612

#### Murphy C, Alvardo J, Juster R (1984)

Prenatal and postnatal growth of the human Descemet's membrane Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 25, 1402-1415

#### Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T (1986)

Distribution of types I, II, III, IV, and V collagen in normal and keratoconus corneas *Ophthalmol. Res. 18, 1-10* 

#### Newsome DA, Groos J, Hassel JR (1982)

Human corneal stroma contains three distinct collagens Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 22, 376-381

#### Paton D, Martinez M (1968)

Corneal tissue preservation for penetrating keratoplasty. Past, present, future *Int. Surg.* 49, 428-435

#### Petroll WM, Ma L, Jester JV, Cavanagh HD, Bean J (2001)

Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing *Cornea* 20,73-80

#### Power H (1872)

zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: Corneal Transplantation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1966: p.

#### de Quengsy P (1796)

Precis au cours d'operations sur la chirurgie des yeux. Didot Paris. Zitiert von Leigh AL (Hrsg) in: Corneal Transplantation. *Blackwell Scientific Publications, Oxford,1966: p. 1* 

#### Reim M, Turss R (1968)

Metabolitspiegel im Corneaendothel und Kammerwasser bei Rindern Graefe's Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 215, 341-348

### Reim M (1985)

Hornhaut und Bindehaut Biochemie des Auges 13-46

#### Richtlinien zum führen einer Hornhautbank (2000)

Deutsches Ärzteblatt 97, 31-32

#### Ruoslahti E (1996)

RGD and other recognition sequences for integrins *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 12, 697-715

#### Schulz G, Cipolla L, Whitehouse A, Eiferman R, Woost P, Jumblatt M (1992)

Growth factors and corneal endothelial cells: III. Stimulation of adult human corneal endothelial cell mitosis in vitro by defined mitogenic agents *Cornea 11, 20-27* 

#### Schwartz BD, McCulley JP (1981)

Morphology of transplanted corneal endothelium derived from tissue culture Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 20, 467-480

#### Senoo T, Obara Y, Joyce N (2000)

EDTA: a promoter of proliferation in human corneal endothelium *Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 41*,2930-2935 ´

#### Shapiro MS, Friend J, Thoft RA (1981)

Corneal re-epithelization from the conjunctiva Invest. Ophthalmol. Vis. Sic. 21: 135-142

#### Suda T (1984)

Mosaic pattern changes in human corneal endothelium with age *Jpn. J. Ophthalmol.* 28-331

#### Sundmacher R, Reinhard T(2001)

Bedarfsdeckung mit qualitätsgesicherten Hornhauttransplantaten *Ophthalmologe* 98,.277-284

#### Thoft RA, Wiley LA, Sundarraj N (1989)

The multipotental cells of the limbus *Eye 3,109-113* 

#### Treffers WF (1982)

Human corneal endothelial wound repair Ophthalmology 89,605-613

#### Waring GO, Bourne WM, Edelhauser HF, Kenyon KR (1982)

The corneal endothelium: normal and pathologic function *Ophthalmol. 89*, *531-590* 

#### Waltmann SR, Hart WM (1987)

The cornea Adler's Physiology of the eye 36-60

#### Yue BYJT, Baum JL (1976)

The synthesis of glycosaminoglycans by cultures of rabbit corneal endothelial and stromal cells *Biochem. J 158, 567-574* 

## Zirm E (1906) Eine erfolgreiche totale Keratoplastik. *Archiv für Ophthalmologie 64, 580-593*

#### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese 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. Angenommen vom Fachbereich Medizin der Universität Hamburg am:

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

Tag der Disputation: 02.12.2003