

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Aus dem Institut für Experimentelle Ophthalmologie  
der Augenklinik

Geschäftsführender Direktor:  
Prof. Dr. med. Gisbert Richard

## **Entwicklung von Methoden zur Isolation von Murinen Retinalen Pigmentepithelzellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Allan Brolund  
aus Flensburg

Hamburg 2015



**(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)**

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.06.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. A. Hassenstein**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. O. Strauß**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. T. Eschenhagen**

# Abstract

Das retinale Pigmentepithel (RPE) ist eine Einzelzellschicht, die zwischen den Photorezeptoren und der Bruchschen Membran in der hinteren Augenkammer lokalisiert ist. Das RPE hat zahlreiche Funktionen wie die Absorption von Licht, den Transport von Ionen und Wasser, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Weiterhin sezerniert das RPE verschiedene Wachstumsfaktoren sowie immunmodulierende Faktoren. Ein Versagen in der Ausführung der verschiedenen Tätigkeiten des RPEs kann zu unterschiedlichen Photorezeptordegenerationen bis hin zum Verlust der Sehkraft führen.

Auch wenn die Erforschung des RPEs in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat, so sind zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen nach wie vor unverstanden. Diese Funktionen sind jedoch für das Verständnis von retinalen Erkrankungen wie z.B. retinale Degeneration sowie für die Entwicklung von gezielten Therapien von großer Bedeutung. Die existierende Literatur bezieht sich zu einem großen Teil auf Daten, die durch die Erforschung von RPE-Zellen von Ratten und Zelllinien gewonnen wurden. Viele Pathologien werden jedoch in Form von genetisch veränderten Mausmodellen nachvollzogen. Die wachsende Anzahl von Mausmodellen für retinale Erkrankungen sowie Mausmodelle mit gezielten genetischen Veränderungen zum Studium bestimmter Signalkaskaden wird das Studium der Zellfunktionen des RPE sowie dessen Beteiligung bei retinalen Erkrankungen ermöglichen. Dabei ist die Isolierung von RPE-Zellen aus Mäusen die entscheidende Methode zur Entwicklung von bestehenden und neuen Modellen.

Ziel: Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur Isolation von murinen RPE-Zellen, um sie der Forschung für die Untersuchung verschiedener

biologischer Fragestellungen mittels diverser Zellfunktionsmessungen zugänglich zu machen.

Methoden: Es wurden unterschiedliche Methoden zur Zellisolierung herangezogen und systematisch für eine Optimierung modifiziert. Hierzu gehörten unter anderem: Vorbehandlung mit unterschiedlichen Lösungen, Calciumentzug, enzymatische Behandlung und mechanische Manipulation.

Ergebnisse: In meiner Arbeit entwickelte ich Methodenprotokolle zur Isolation von RPE Zellen der Maus. Die entwickelten Protokolle ermöglichen mit reproduzierbarem Erfolg die Isolierung von frischen RPE-Einzelzellen sowie frischer nativer RPE-Zellverbände und damit die Untersuchung von RPE-Zellfunktionen sowohl auf Einzelzellebene als auch auf der Ebene des Zellverbandes und der Zellkultur. Weiterhin können beide Präparationen auch als Zellkulturen ex vivo kultiviert und für weitere Untersuchungen genutzt werden.

Diskussion: Die Entwicklung der Isolationsprotokolle ermöglicht die Herstellung von RPE-Einzelzellen, nativer RPE-Zellverbände und RPE-Zellen zur Herstellung von RPE-Zellkulturen. Die Proliferationsfähigkeit der isolierten RPE-Zellen in der Zellkultur ist gegeben, jedoch limitiert, sodass für größere Kulturen größere Mengen an Bulbi verarbeitet werden müssen. Die jeweiligen Endprodukte konnten in unserem Labor für die Untersuchung mit verschiedenen Techniken, z.B. Messung von Ionenkanalströmen mittels Patch Clamp, Immunocytochemie und transepitheliale Widerstandsmessungen genutzt werden.

Viele Pathologien werden in Form von genetisch veränderten Mausmodellen nachvollzogen. Die Existenz dieser Mausmodelle ermöglicht in Kombination mit der entwickelten Isolationsmethode weitere Ansätze zur Erforschung der bekannten Pathologien. So können Prozesse wie die RPE-Sekretion und immunologische Prozesse untersucht werden.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Das Auge . . . . .	3
2.1.1	Anatomischer Aufbau . . . . .	3
2.1.2	Die Retina . . . . .	4
2.1.2.1	Anatomie der Retina . . . . .	4
2.1.2.2	Funktionsweise der Retina . . . . .	5
2.1.3	Retinales Pigmentepithel RPE . . . . .	5
2.1.3.1	Anatomischer Aufbau des RPE . . . . .	5
2.1.3.2	Funktion des RPE . . . . .	6
2.2	Erkrankungen von Retina und RPE . . . . .	7
2.3	RPE-Forschung . . . . .	8
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
3.0.1	Chemikalien und Lösungen . . . . .	10
3.0.2	Zellkulturmedien . . . . .	11
3.0.3	Material für die Zellisolierung und Kultur . . . . .	11
3.0.4	Material für die Immuncytochemie . . . . .	12
3.1	Geräte . . . . .	12
3.2	Zellkulturmedien und Supplemente . . . . .	14
3.2.1	Basalmedium F99 . . . . .	14
3.2.2	F99 RPE-Wachstumsmedium . . . . .	14
3.2.3	F99 RPE-Wachstumsmedium Ca <sup>2+</sup> -free . . . . .	15
3.2.4	F199 RPE-Wachstumsmedium . . . . .	15

3.2.5	ARPE-19-Zellkulturmedium . . . . .	16
3.2.6	Pucksche Lösung . . . . .	16
3.2.7	Dissoziations Puffer . . . . .	16
3.2.7.1	PBS-EDTA . . . . .	17
3.2.7.2	L-Cystein-Lösung . . . . .	17
3.2.7.3	BSA-Lösung . . . . .	17
3.2.8	Beschichtung: . . . . .	17
3.2.9	Zusätze . . . . .	17
3.3	RPE-Zellisolation . . . . .	18
3.3.1	Isolation von RPE-Einzelzellen . . . . .	18
3.3.2	Isolation von RPE-Sheets . . . . .	24
3.3.3	Herstellung von primären RPE-Zellkulturen . . . . .	26
3.3.4	Kriterien zur Bewertung des Isolationserfolges . . . . .	27
3.3.4.1	Bewertungskriterien bei der Herstellung von Primärkulturen . . . . .	28
3.3.4.2	Bewertungskriterien bei der Isolation von Einzelzellen . . . . .	29
3.3.4.3	Bewertungskriterien bei der Isolation von RPE-Sheets . . . . .	29
3.4	Zellzählung . . . . .	30
3.5	Analyse von RPE-Zellfunktionen . . . . .	30
3.5.1	Immuncytochemische Färbungen . . . . .	30
3.5.1.1	Färbungsprotokoll . . . . .	31
3.5.2	Methode der transepithelialen Widerstandsmessung an Kulturzellen . . . . .	32
3.5.2.1	Statistische Analyse . . . . .	34
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
4.1	Entwicklung der Isolationsprotokolle . . . . .	35
4.1.1	Vorbehandlung . . . . .	35
4.1.1.1	Vorbehandlung vor der Entfernung des anterioren Augensegmentes . . . . .	36
4.1.1.2	Vorbehandlung nach der Entfernung des anterioren Augensegmentes . . . . .	37

---

4.1.1.3	Zusammenfassung . . . . .	38
4.1.2	Mechanische Manipulation . . . . .	44
4.1.2.1	Abschaben des RPE-Gewebes . . . . .	45
4.1.2.2	Titration des Bulbus . . . . .	45
4.1.2.3	Gezieltes Anspülen des Bulbus . . . . .	45
4.1.2.4	Zusammenfassung . . . . .	46
4.1.3	Enzymatische Behandlung . . . . .	49
4.1.3.1	Enzymatische Behandlung vor Präparation der Re- tina . . . . .	49
4.1.3.2	Enzymatische Behandlung nach Entfernung der Re- tina . . . . .	51
4.1.3.3	Enzymatische Behandlung vor und nach Entfer- nung der Retina . . . . .	52
4.1.3.4	Zusammenfassung . . . . .	53
4.2	Zellkultur . . . . .	63
4.2.1	Zusätze . . . . .	69
4.2.1.1	Zusammenfassung . . . . .	69
4.2.2	TER-Messung . . . . .	69
4.2.3	Immunhistochemie an RPE in vitro . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> . . . . .	<b>74</b>
5.1	Isolationsprotokolle . . . . .	74
5.1.1	Vorbehandlung . . . . .	74
5.1.2	Enzymatische Behandlung . . . . .	75
5.1.3	Mechanische Manipulation . . . . .	76
5.1.4	Zusammenfassung Isolationsprotokolle . . . . .	77
5.2	Anwendungen der Ergebnisse und weitere Fragestellungen . . . . .	81
5.3	Ausblick . . . . .	82
<b>6</b>	<b>Appendix</b> . . . . .	<b>84</b>
6.1	Tabellen . . . . .	84
6.2	Transepithelialer Widerstand . . . . .	92

---

6.3	Abbildungen . . . . .	94
6.4	Erklärung . . . . .	97
6.5	Abkürzungen . . . . .	98
6.6	Danksagung . . . . .	99
6.7	Lebenslauf . . . . .	100

# Kapitel 1

## Arbeitshypothese und Ziel der Arbeit

Das Retinale Pigmentepithel (RPE) erfüllt zahlreiche essenzielle Aufgaben für die Funktion der Photorezeptoren wie Sekretion, Phagozytose und Lichtabsorption im Auge. Defizite in der Ausführung dieser Funktionen können zu Erkrankungen des Auges (Allikmets, 2000), (Allikmets et al., 1997), (Woodruff et al., 2003), bis hin zum Sehverlust führen (Strauss, 2005), (Klein et al., 2004), Thompson et al. (2002) und (Rivolta et al., 2002). Das Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie des RPE ist daher bedeutend für die weitere Erforschung retinaler Erkrankungen. Für die Erforschung des RPE stehen verschiedene Zellmodelle (Frosch, Kaninchen, Huhn, Mensch, Kuh, Ratte, Maus, Zelllinien) zur Verfügung siehe Tabelle 5.1 . Demgegenüber steht eine große und weiter wachsende Anzahl von Mausmodellen für retinale Erkrankungen mit gezielten genetischen Veränderungen. Um das volle Potential dieser Mausmodelle ausschöpfen zu können, ist die zuverlässige Isolation von murinen RPE-Zellen essenziell (Schlichtenbrede et al., 2002). Tabelle 5.1 zeigt einen Überblick der verschiedenen Isolationsmethoden von RPE-Zellen unterschiedlicher Spezies.

In unserem Labor probierten wir speziell die Isolationsmethoden für die Gewinnung von murinen RPE-Zellen aus (Gibbs and Williams, 2003), (Geisen et al., 2006), die jedoch zu unbefriedigenden Ergebnissen führten. Aus diesem Grund entschieden

wir uns, eine neue Methode zur Isolation von murinen RPE-Zellen zu entwickeln. Diese Methode sollte es ermöglichen, murine RPE-Zellen sowohl für die Herstellung von RPE-Zellkulturen als auch für die Gewinnung von RPE-Einzelnzellen und RPE-Zellen im Zellverband zu isolieren.

# Kapitel 2

## Einleitung

### 2.1 Das Auge

#### 2.1.1 Anatomischer Aufbau

Der Augapfel (Bulbus oculi) der Wirbeltiere wird in einen vorderen und einen hinteren Teil gegliedert. Im vorderen Teil des Auges befinden sich die Hornhaut (Cornea), die vordere und hintere Augenkammer sowie die Iris und die Linse. Im hinteren Teil befinden sich der Glaskörper und die Retina, die dem RPE und der Choroidea aufliegen. Der anatomische Aufbau des Auges ist in Abbildung 2.1.1 links oben dargestellt.

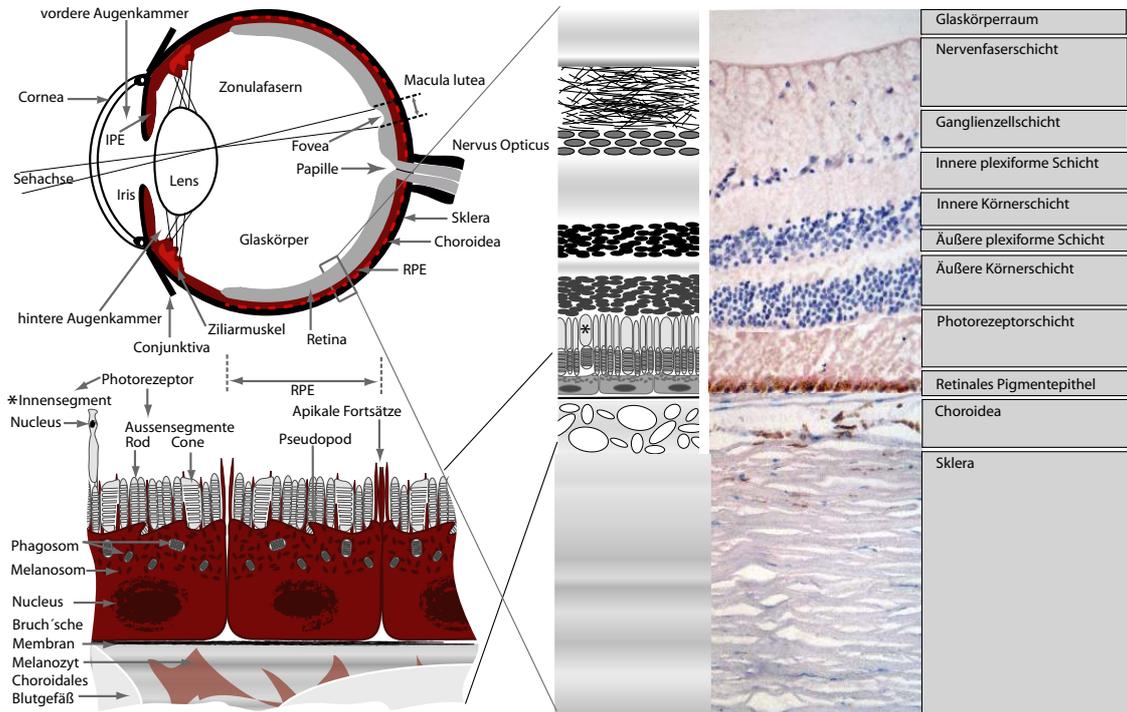


Abbildung 2.1: Zur Anatomie des Auges: (oben links) Horizontalschnitt durch das menschliche Auge, (rechts) vergrößerter Ausschnitt durch die Schichten der Netzhaut mit Choroidea und Sklera und (unten links) Schemazeichnung der Interaktion von Retinalem Pigmentepithel (RPE) mit den Außensegmenten der Netzhaut (Karl, 2006).

## 2.1.2 Die Retina

### 2.1.2.1 Anatomie der Retina

Die Retina ist 0,27 mm bis 0,5 mm dünn, sie ist lichtdurchlässig und lässt sich in den lichtempfindlichen Abschnitt Pars optica, der dem Augenhintergrund aufliegt, den lichtunempfindlichen Pars iridica retinae dorsal der Iris und die ebenfalls lichtunempfindliche Pars plana an der Innenfläche des Corpus ciliare einteilen. Die lichtunempfindlichen Teile werden als Pars caeca zusammengefasst. Die Retina besteht aus zwei Schichten. Die äußere Schicht wird von einer Pigmentepithelschicht (Stratum pigmentosum) gebildet und erstreckt sich vom Sehnerveneintritt bis zur Ora serrata. Die neurosensorische Retina bildet die innere Schicht. Im Bereich der

Pars caeca besteht die Retina aus indifferenten Epithelzellen. Im Bereich der Pars optica enthält sie die Photorezeptoren und zwei Schichten von Nervenzellen, das Stratum nervosum.

Die Photorezeptorschicht beinhaltet zwei unterschiedliche Gruppen von Zellen, Stäbchenzellen und Zapfenzellen, die unterschiedlich angeordnet sind: Zentral im Bereich der Fovea centralis befinden sich hauptsächlich Zapfenzellen, peripher dominieren die Stäbchenzellen. Die Struktur der Photorezeptoren ist in Abbildung 2.1 links unten aufgeführt. Sie gliedert sich in ein Außensegment, ein Innensegment, einen kerntragenden Abschnitt und einen Endkolben. Die Photorezeptoren liegen dem Retinalen Pigmentepithel (RPE) auf.

### 2.1.2.2 Funktionsweise der Retina

Die Retina dient der Wahrnehmung von Licht im Wellenlängenspektrum von 380 nm bis 740 nm. Das Licht passiert den optischen Apparat des Auges bestehend aus Hornhaut, Kammerwasser, Linse und Glaskörper bevor es auf die Retina mit den Photorezeptoren trifft. Dort findet die photoelektrische Transduktion, also die Umwandlung von Lichtenergie in eine elektrische Erregung statt. Dies geschieht durch das Zusammenspiel von Sehfärbstoffen, Enzymen und Signalmolekülen in einer Signalverarbeitungskaskade, an deren Ende es zu einer Hyperpolarisation von ca. -55 mV kommt. Diese hemmt die Freisetzung des Transmitters Glutamat an der Synapse des Sensors und bewirkt in den nachgeschalteten Retinaneuronen eine Potenzialänderung, führt also zum elektrischen Signal.

## 2.1.3 Retinales Pigmentepithel RPE

### 2.1.3.1 Anatomischer Aufbau des RPE

Das RPE ist einschichtig, isoprismatisch und steht in direktem anatomischen Kontakt mit den Photorezeptoren, die auf der apikalen Seite des RPE liegen. Auf der basolateralen Seite befindet sich die Bruchsche Membran. Das RPE bildet einen Teil der Blut-Retina-Schranke zwischen subretinalem Spalt und der gefäßreichen Aderhaut, der Choroidea. Der anatomische Aufbau des RPE ist schematisch in

Abbildung 2.1.1 unten links dargestellt.

### 2.1.3.2 Funktion des RPE

Die wesentlichen Funktionen des RPE sind in Abbildung 2.2 dargestellt (Strauss, 2005). Das RPE absorbiert auf die Retina fokussiertes Licht (Bok, 1993) und transportiert Ionen, Wasser und metabolische Produkte aus dem subretinalen Raum in das Blut. Darüber hinaus versorgt es die Photorezeptoren mit Nährstoffen wie Glukose, Retinol und Fettsäuren aus dem Blut (Dornonville, 1993), (Hamann, 2002), (Marmor, 1999), (Miller and Edelman, 1990), (Steinberg, 1985). Das RPE partizipiert am Sehzyklus, indem es all-trans-retinal aufnimmt und es zu 11-cis-retinal reisomerisiert, bevor es zurück zu den Photorezeptoren transportiert wird (Baehr et al., 2003), (Thompson and Gal, 2003), (Besch et al., 2003). Darüber hinaus stabilisiert das RPE durch den epithelialen Transport von Ionen die Ionenkonzentration im subretinalen Spalt (Dornonville, 1993), was eine wichtige Rolle für die Erregbarkeit von Photorezeptoren spielt. Durch die Phagozytose der Außensegmente der Photorezeptoren und deren Wiederverwertung trägt das RPE weiter zur Aufrechterhaltung der Lichtsensitivität bei. Zudem sezerniert das RPE zahlreiche Wachstumsfaktoren, wodurch es dabei hilft, die strukturelle Integrität des Endothels, des Kapillarsystems und der Photorezeptoren aufrecht zu erhalten. Zuletzt spielt das RPE durch die Sekretion von immunologischen Faktoren (Streilein et al., 2002), (Ishida et al., 2003) eine wichtige Rolle für das Immunprivileg des Auges. Die enge Verflechtung zwischen RPE und Retina unterstreicht die Bedeutung des RPE für das Visuelle System und verdeutlicht die gravierenden Folgen einer Erkrankung des RPE für eben dieses System.

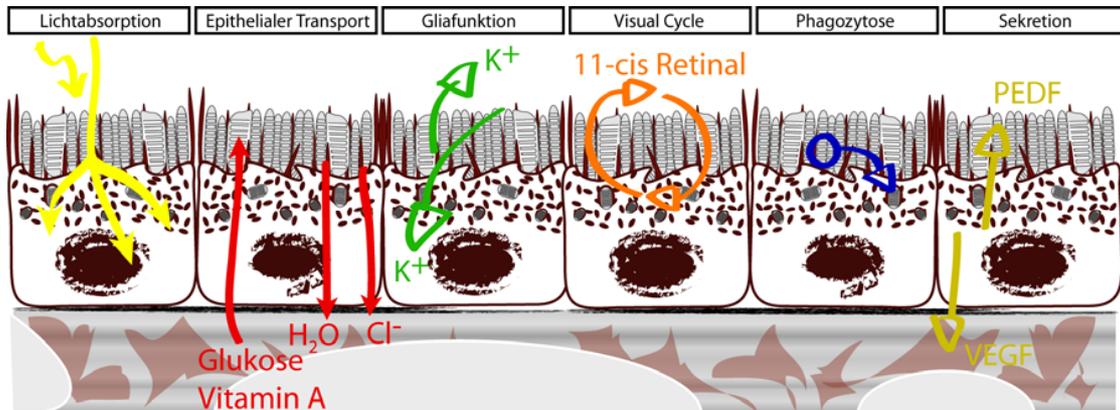


Abbildung 2.2: Zusammenfassung elementarer Funktionen des Retinalen Pigmentepithel (modifiziert nach Strauss (2005), (Karl, 2006)); VEGF = vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; PEDF = pigmentepithelialer Wachstumsfaktor

## 2.2 Erkrankungen von Retina und RPE

Erkrankungen der Retina (Retinopathien) haben verschiedene Ursachen. Zum einen gibt es alimentäre Ursachen bei einer Mangelversorgung mit Sauerstoff durch Gefäßveränderungen. Hierbei kommt es im Rahmen der lokalen Hypoxie, wie z.B. bei der diabetischen Retinopathie, zur Freisetzung von angiogenen Faktoren wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und IGF1 (Insulin like Growth Factor 1) und zur epiretinalen Neovaskularisation. Im weiteren Verlauf kann es bei einer erhöhten Gefäßpermeabilität zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke mit konsekutiver Ausbildung eines Makulaödems kommen. Weitere Ursachen für ischämische Veränderungen der Retina sind retinale Venen- und Arterienverschlüsse oder Veränderungen im Rahmen einer arteriellen Hypertonie.

Zum anderen gibt es degenerative Ursachen häufig aufgrund von genetischen Defekten wie im Falle der altersbedingten Makuladegeneration (AMD).

Diese ist eine chronisch progrediente Erkrankung der Retina und der häufigste Grund für eine Erblindung jenseits des 60. Lebensjahres (Friedman et al., 2004). Es wird zwischen einer neovaskulären- (feuchten) und einer atrophischen (trockenen) Form unterschieden (Lim et al., 2012). Bei der neovaskulären Form der AMD

kommt es zu einem Gefäßwachstum aus der Chorioidea in die Retina. Im weiteren Verlauf entwickeln sich Leckagen und Blutungen auf die ein Narbenbildung folgt. Bei der atrophischen Form kommt es zu einer Atrophie des RPE, der Chorioidea und der Photorezeptoren (Herrmann et al., 2013).

Die Entstehung der Erkrankung ist multifaktoriell verursacht (Ambati et al., 2003). Risikofaktoren sind Umwelteinflüsse und Verhaltensweisen wie Rauchen (Christen et al., 1996), Übergewicht (Seddon et al., 2003), Vitaminmangel (Smith et al., 2001) und kardiovaskuläre Risikofaktoren (Reynolds et al., 2010), sowie genetische (Scholl et al., 2007) und oculäre Risikofaktoren wie Hyperopie (Sandberg et al., 1993).

Eine andere heterogene Erkrankungsgruppe ist die der Retinopathia pigmentosa (Phelan and Bok, 2000), bei der es zu einer Degeneration der Retina entweder ausgehend von einer Funktionsstörung des RPE oder der Retina kommt. Weitere Beispiele für kongenitale degenerative Erkrankungen der Retina sind Morbus Best, Morbus Stargardt, Fundus albipunctatus (Besch et al., 2003) und die Lebersche Amaurose (Fazzi et al., 2003).

Weitere Ursachen für Erkrankungen der Retina und des RPE, auf die in dieser Arbeit nicht eingegangen werden wird, sind entzündliche Prozesse, verursacht durch Viren, Bakterien, Parasiten oder autoimmunologische Vorgänge.

## 2.3 RPE-Forschung

Zur Erforschung des RPE stehen frisch isolierte Einzelzellen, Zelllinien und Zellkulturmodelle verschiedener Spezies zur Verfügung. Die RPE-Zellkultur spielt dabei eine besondere Rolle, da Zellkulturmodelle eine Vielzahl von Funktionsuntersuchungen wie z.B. Sekretions- und Phagozytoseuntersuchungen unter reproduzierbaren Umständen erlauben.

Transformierte Zelllinien sind dabei eine wichtige Ergänzung. Sie sind einfach und nahezu unverändert verfügbar, was auch zeitlich ausgedehnte Studien ermöglicht. Nachteile von transformierten Zelllinien sind häufig eine veränderte Morphologie, der Verlust von in vivo-Charakteristika und Chromosomenaberrationen.

Primäre RPE-Zellkulturen werden aus Augen verschiedener Spezies hergestellt. Die entstehenden Kulturen sind im Gegensatz zu transformierten Zelllinien begrenzt teilungsfähig und unterliegen im Verlauf der Kultur einer schnellen Dedifferenzierung. Primärkulturen behalten jedoch *in vitro* einen Großteil ihrer *in vivo*-Eigenschaften und unterscheiden sich in ihrem Genexpressionsprofil von transformierten Zellen. Sie eignen sich daher ebenfalls für Genanalysen auf der Expressionsebene und stellen außerdem eine Verbindung zwischen artifiziellen Systemen und *in vivo*-Systemen dar (Schmitz, 2011).

Die Mehrzahl der Zellkulturdaten des RPE werden jedoch nicht an Mäuse-RPE erhoben. Dies begründet sich unter anderem dadurch, dass das Maus-RPE ein sehr fragiles Gewebe ist und die bestehenden Protokolle zur Isolation von RPE von Mäusen nicht zur suffizienten reproduzierbaren Produktion von RPE-Zellkulturen geeignet sind. Hinzu kommt, dass die bisherige RPE-Zellkultur Artefakt behaftet ist, was sich negativ auf an ihr gewonnene Ergebnisse auswirken kann.

Für zahlreiche hereditäre Erkrankungen die das RPE betreffen sind inzwischen ursächliche Genmutationen, z.B. Mutationen des ABCR4-Gens, das mit M. Stargardt assoziiert ist (Azarian and Travis, 1997), oder des RDH5-Gens, das mit Fundus Albipunctatus assoziiert ist gefunden worden (Yamamoto et al., 1999), (Gonzalez-Fernandez et al., 1999). Diese Genmutationen sind teilweise in transgenen Mausmodellen nachvollzogen worden (Driessen et al., 2000), (Weng et al., 1999).

Es besteht daher die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Protokolle zur Isolation von RPE-Zellen bei Mäusen mit hoher Reproduzierbarkeit und wenig zellulären Artefakten zur Herstellung von Einzelzellen, Zellverbänden und Kulturen. Dadurch können die in transgenen Mausmodellen exprimierten Pathologien *in vitro* weiter erforscht werden.

Um diese Protokolle zu entwickeln übertrug ich die gängigen, in der Literatur beschriebenen Techniken zur Isolation von RPE-Zellen verschiedener Spezies auf die Isolation von murinen RPE-Zellen. Diese verglich ich systematisch miteinander, um mögliche Fehlerquellen zu erkennen und erweiterte die Protokolle durch eigene Lösungen.

# Kapitel 3

## Material und Methoden

### 3.0.1 Chemikalien und Lösungen

Die folgenden Chemikalien und Lösungen wurden verwendet:

Tabelle 3.1: Chemikalien und Lösungen

Reagenz	Hersteller
Insulin-Transferrin-Natrium Selenite	Roche
Gelantine	Biochrom
Fibronektin (bovine)	-Gibco BRL Life Technologies
Hepes 1M	-Gibco BRL Life Technologies
MEM Non Essential Amino Acids (w l-Glutamin)	-PAA Laboratories GmbH
Amphotericin B	-Gibco BRL Life Technologies
Gentamicin	-Gibco BRL Life Technologies
Penicillin/Streptomycin (100x)	-PAA Laboratories GmbH
FCS	-Sigma
Natrium Pyruvat	-Biochrom
Poly-L-Lysin	-Sigma
PBS (w $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ )	-Gibco BRL Life Technologies

*Fortsetzung nächste Seite...*

... Fortsetzung

Reagenz	Hersteller
Accutase	-PAA Laboratories GmbH
Collagenase IV	-Sigma (C-9891, C-2674)
Papain	-Sigma (P-3125)
Trypsin-EDTA (10x)	-Gibco BRL Life Technologies
Trypsin-EDTA (1x) (HBSS w $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ )	-Gibco BRL Life Technologies
Dispase	
BSA	-Sigma
FGFb	-Biosource (N102810)
EGF	-Biosource (22625-07S)
L-Cysteine	-Sigma
EDTA	-Sigma
EGTA	-Roth

### 3.0.2 Zellkulturmedien

Tabelle 3.2: Zellkulturmedien

Reagenz	Hersteller
D-MEM:F-12 (L-Glutamin)	-Gibco BRL Life Technologies
Medium 199 (mit Earle's Salzen, L-Glutamin)	-Gibco BRL Life Technologies
DMEM High Glucose (w Sodiumpyr, L-Glutamin)	-PAA Laboratories GmbH
HAM'S F-12 K (w $\text{Ca}^{2+}$ , Phenol Red, Glutamine)	-Biosource
F-12 (Ham) (L-Glutamine)	-Gibco BRL Life Technologies
Med-199 (H) (w $\text{Ca}^{2+}$ , Phenol Red, Glutamine)	-Biosource
F-10 (Ham) (L-Glutamine)	-Gibco BRL Life Technologies
F-12 (Ham) Nutrient Mixture (L-Glutamine)	-Gibco BRL Life Technologies

### 3.0.3 Material für die Zellisolierung und Kultur

Tabelle 3.3: Material für die Zellisolierung und Kultur

Bezeichnung	Hersteller
Bottletop Filter (0,22 $\mu$ m Porengröße)	-Millipore
Chamber Slides	-Nunc
Pipettenspitzen, silikonisiert	-Biozym
Kulturschalen	-Sarstedt
Kulturschalen 24-Loch	-Sarstedt
Kulturschalen 12-Loch	-Cellstar
TransKavität® Filter	-Costar
15ml Röhren	-Sarstedt
Mikro-Schraubröhre 2ml	-Sarstedt
Zellsieb, 40 $\mu$ m, Nylon	-Falcon

### 3.0.4 Material für die Immuncytochemie

Tabelle 3.4: Material für die Immuncytochemie

Bezeichnung	Hersteller
Goat Serum (Normal)	-Dako
Maus-Anti-Cytokeratine -Monoclonal Antibody	-Sigma
Ziegen-Anti-Maus	-Jackson IR inc
Aqua Poly/Mount	-Polysciences, Inc.

## 3.1 Geräte

Tabelle 3.5: Allgemeine Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Modell
Waage	Ohaus Explorer E06120

*Fortsetzung nächste Seite...*

*... Fortsetzung*

Bezeichnung	Hersteller/Modell
Feinwaage	Mettler Toledo AG 240 (d=0,1 mg / max 210 g)
pH.Meter	inoLab pH level 1, Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Pipetten	Reference (0,5 $\mu$ l-20 $\mu$ l / 20 $\mu$ l-100 $\mu$ l / 100 $\mu$ l-1000 $\mu$ l), Eppendorf AG
Inkubator	Inkubator1000 mit Unimax1019, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Thermoblock	TM1, Biometra biomedizinische Analytik GmbH
Zentrifuge	Z 233 MK-2, Hermle
Zentrifuge	Microcentrifuge 1236V
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R
Magnetrührer	Stuart, Bibby Scientific Ltd, United Kingdom
Mikroskop	Leica

Tabelle 3.6: Zellkultur - Geräte

Bezeichnung	Hersteller/Modell
Präparationsmikroskop	Carl Zeiss Operationsmikroskop
Zellkulturschrank	Hera Cell 240, Heraeus
Sterile Werkbank	Gelaire BSB 4A, ICN Biomedicals

## 3.2 Zellkulturmedien und Supplemente

### 3.2.1 Basalmedium F99

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

9.875 g/l Medium 199

10.625 g/l Ham's F12

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

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

und weiterem Rühren sollte der pH-Wert bei  $7.40 \pm 0.05$  liegen. War dies nicht der Fall, konnte mit NaOH 1 M oder HCl 1 M nachgestellt werden. Das Medium wurde anschließend sofort steril filtriert (Porengröße  $0.22 \mu m$ ) und bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.2 F99 RPE-Wachstumsmedium

Ham's F12 M 199 1:1 mischen

= F99

pH= 7.4

+ 10 % FCS

+ 1 mM Natriumpyruvat (5 ml auf 500 ml Medium)

+ 1  $\mu g/ml$  Insulin (50  $\mu l$  auf 500 ml Medium)

+ 2,5 ml Gentamycin (Stock 50mg/ml, End  $50\mu g/ml$ ) auf 500 ml Medium

+ 5 ml Amphotericin B (Stock  $250\mu g/ml$ , End  $2,5\mu g/ml$ ) auf 500 ml Medium

Das Medium wurde durch einen sterilen Filter ( $0.22 \mu m$ ) filtriert und bei  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.2.3 F99 RPE-Wachstumsmedium Ca<sup>2+</sup>-free

Ham'S F-12 K (w Ca<sup>2+</sup>, Phenol Red, Glutamine)/ Med-199 (H) (w Ca<sup>2+</sup>, Phenol Red, Glutamine) 1:1 mischen

= F99

pH= 7.4

+ 10 % FCS

+ 1 mM Natriumpyruvat (5 ml auf 500 ml Medium)

+ 1  $\mu$ g/ml Insulin (50  $\mu$ l auf 500 ml Medium)

+ 2,5 ml Gentamycin (Stock 50mg/ml, End 50 $\mu$ g/ml) auf 500 ml Medium

+ 5 ml Amphothericin B (Stock 250 $\mu$ g/ml, End 2,5 $\mu$ g/ml) auf 500 ml Medium

Das Medium wurde durch einen sterilen Filter (0.22  $\mu$ m) filtriert und bei +4 °C gelagert.

### 3.2.4 F199 RPE-Wachstumsmedium

M 199

pH= 7.4

+ 10 % FCS

+ 1 mM Natriumpyruvat (5 ml auf 500 ml Medium)

+ 1  $\mu$ g/ml Insulin (50  $\mu$ l auf 500 ml Medium)

+ 2,5 ml Gentamycin (Stock 50mg/ml, End 50 $\mu$ g/ml) auf 500 ml Medium

+ 5 ml Amphothericin B (Stock 250 $\mu$ g/ml, End 2,5 $\mu$ g/ml) auf 500 ml Medium

Das Medium wurde durch einen sterilen Filter (0.22  $\mu$ m) filtriert und bei +4 °C gelagert.

### 3.2.5 ARPE-19-Zellkulturmedium

500 ml DMEM/Ham's F12 1:1 + Glutamin  
+ 50 ml (10 %) Fetales Kälberserum (Cansera)  
+ 5 ml Penicillin/Streptomycin  
+ 250 ml Insulin-Transferrin-Sodium (Roche)  
+ 5 ml non essential aminoacids  
+ 2,5 ml HEPES-Puffer (1M)

Das Medium wurde durch einen sterilen Filter (0.22  $\mu\text{m}$ ) filtriert und bei 4°C gelagert.

### 3.2.6 Pucksche Lösung

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

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

Die Lösung (pH 8.0) wurde durch einen Filter mit 0.22  $\mu\text{m}$  Porengröße filtriert, um sie zu sterilisieren.

### 3.2.7 Dissoziations Puffer

Der Dissoziations-Puffer wurde wie folgt hergestellt:

875  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA

115  $\mu$ l L-Cys-Lösung

10  $\mu$ g BSA

Das Gemisch wurde bei 4°C bis zu einer Woche gelagert.

### **3.2.7.1 PBS-EDTA**

Das PBS-EDTA wurde in einer Konzentration von 1mM in PBS wo Ca/Mg angesetzt, bei einem pH-Wert von 7,2 eingestellt und bei 4°C gelagert.

### **3.2.7.2 L-Cystein-Lösung**

Die L-Cystein-Lösung wurde in einer Konzentration von 26 mM/ml in PBS wo Ca/Mg angesetzt und bei 4°C bis zu einer Woche gelagert.

### **3.2.7.3 BSA-Lösung**

Die BSA-Lösung wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in PBS wo Ca/Mg angesetzt und bei -20°C gelagert

## **3.2.8 Beschichtung:**

Die Oberflächen der jeweiligen Kulturgefäße wurden mit einer Substanz zur besseren Zelladhäsion bestrichen und an der Luft getrocknet.

Verwendete Substanzen:

1. Fibronectin (Gibco)
2. Gelantine (Biochrome)

## **3.2.9 Zusätze**

Zur schnelleren Proliferation der ausgesäten Zellen wurden einige Kulturen mit Zusätzen von Wachstumsfaktoren stimuliert. Es wurden dazu bFGF in einer Kon-

zentration von 20 ng/ml und EGF in einer Konzentration von 10 mg/ml drei mal pro Woche zur Kultur hinzugegeben.

### 3.3 RPE-Zellisolation

Die in dieser Arbeit entwickelten und etablierten Protokolle zur Isolierung von RPE-Einzelzellen, RPE-Sheets und RPE-Kulturzellen sind im Folgenden kurz aufgeführt, im Ergebnisteil unter 4.1 werden die einzelnen Ansätze und Testreihen im Detail aufgeführt und die Entwicklung der Protokolle erläutert. Die Präparation der murinen Zellen erfolgte von Augen, die C57/black-WT Mäusen entnommen wurden. Die Versuchstiere wurden in der Tierhaltung des UKE bei 55 % Luftfeuchtigkeit, einer Raumtemperatur von  $22 \pm 2$  °C und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je 12 h gehalten. Ad libitum wurde Haltungsfutter für Mäuse und Wasser zur Verfügung gestellt. Die Präparation wurde, so weit möglich, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Es wurden Mäuse im Alter von drei bis zwölf Wochen eingesetzt.

#### 3.3.1 Isolation von RPE-Einzelzellen

##### Lösungen und Material

- (a) PBS-EDTA (Gibco): 1 mM EDTA (Sigma) in PBS wo Ca/Mg
- (b) L-Cys-Lösung: 26 mM L-Cystein (Sigma) in PBS wo Ca/Mg
- (c) BSA-Lösung: 100 mg/ml bovines Serum Albumin (BSA) in PBS wo Ca/Mg
- (d) Dissoziationspuffer: 875  $\mu$ l PBS-EDTA + 115  $\mu$ l + L-Cys-Lösung + 10  $\mu$ g BSA
- (e) Fibronectin (Sigma): 1 mg/ml
- (f) Zellkulturmedium F99 RPE-Wachstumsmedium siehe 3.2.2
- (g) Kulturschalen (Sarstedt)
- (h) 15 ml Röhrchen (Sarstedt)

- (i) Dissektionsmikroskop (Carl Zeiss Operationsmikroskop)
- (j) Gerade Pinzette (Dumont)
- (k) Spring scissors (Vannas-Tübingen)
- (l) Kanüle 21 Gauge (0,728 mm) (Braun)
- (m) Zentrifuge (Meraeus Megafuge 1.OR)

### **Entnahme und Präparation der Bulbi**

1. Die Versuchstiere werden mit Diethylether anästhesiert und durch cervicale Dislokation getötet (Deklaration von Helsinki).
2. Entnahme der Augen mit Hilfe einer gebogenen Pinzette und Überführung des Auges in PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) unter einem Dissektionsmikroskop.
3. Anhaftendes Muskel- und Conjunktivalgewebe wird mit einer kleinen Schere abpräpariert.
4. Mit einer feinen Kanüle wird dorsal der Ora Serrata ein Loch in den Bulbus gestochen. In das Loch wird der Schenkel einer kleinen Schere eingeführt und das Auge circumferentiell aufgeschnitten. Das anteriore Segment mit Hornhaut, Ziliarkörper, Linse und Glaskörper wird entfernt.

Abbildungen 3.1 a-e zeigt den Ablauf der Präparation.

### **Vorbehandlung**

5. Der entstandene Augenbecher wird in  $37^{\circ}\text{C}$  warmes F99 transferiert und für 15 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
6. Der Augenbecher wird in  $500\mu\text{l}$   $37^{\circ}\text{C}$  warmes PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit 1 mM EDTA überführt und für 40 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augenseite des Augenbechers nach oben.

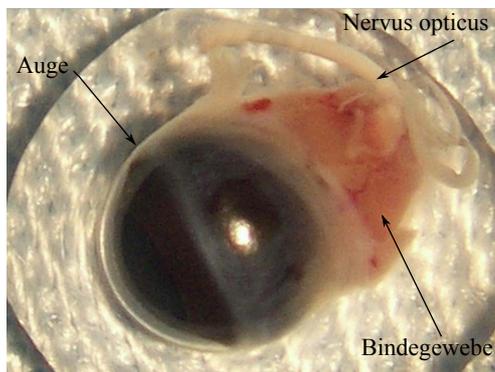
### Entfernung der Retina

7. Der Augenbecher wird, mit der Innenseite nach oben zeigend unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer Pinzette wird die Retina gegriffen und vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Nervus Opticus umgeklappt. Der Nervus Opticus wird durchtrennt und die Retina entfernt.

### Enzymatische Behandlung und Dissoziation des RPE-Gewebes

8. Der Augenbecher wird in eine 24-Loch Kulturschale mit 355  $\mu\text{l}$  Dissoziationspuffer (875  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA + 115  $\mu\text{l}$  L-Cys-Solution + 10  $\mu\text{l}$  BSA) umgesetzt.
9. Das Innere des Augenbechers wird sechs mal mit einem 20  $\mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpuls beschossen, dabei wird das RPE aus dem Augenbecher herausgelöst. Hierzu werden eine 100  $\mu\text{l}$  Pipette und 120  $\mu\text{l}$  zusätzlicher Dissoziationspuffer verwendet. Der Augenbecher wird verworfen.
10. Zu der Zellsuspension werden 25  $\mu\text{l}$  aktiviertes Papain (Papain, Sigma P3125, 18U/mg, 26mg/ml) gelöst in 500  $\mu\text{l}$  Dissoziationspuffer und einer Konzentration von 2 U hinzu pipettiert. Dadurch entsteht ein Endvolumen von 500  $\mu\text{l}$  (355  $\mu\text{l}$  + 6 x 20  $\mu\text{l}$  + 25  $\mu\text{l}$ ) und eine Endkonzentration von 0,1 U. Die Suspension wird für 15 Minuten bei 37° C und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Lösung wird in ein 14 ml Röhrchen überführt und bei 100  $G$  für 3 Minuten herunter zentrifugiert (Acceleration langsam 4, and Deceleration langsam 4).
12. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Zu dem Zell-Pellet werden 5  $\mu\text{l}$  ( $\cong$  5  $\mu\text{g}$ ) Fibronectin hinzugefügt.
14. Das Zell-Pellet wird ad 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturmedium resuspendiert und tropfenförmig in ein 24-Loch oder auf einen kleinen Glas Cover Slip ausgesät. Zur besseren Zelladhäsion wird die jeweilige Oberfläche vorher mit 5  $\mu\text{l}$  Fibronectin bedeckt und luftgetrocknet.

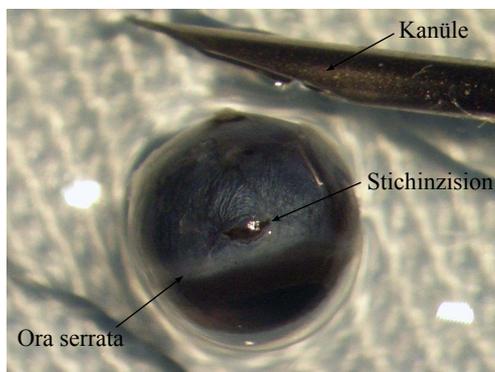
15. Die Zellen werden sobald sie adhären sind, spätestens aber nach 24 Stunden eingesetzt.



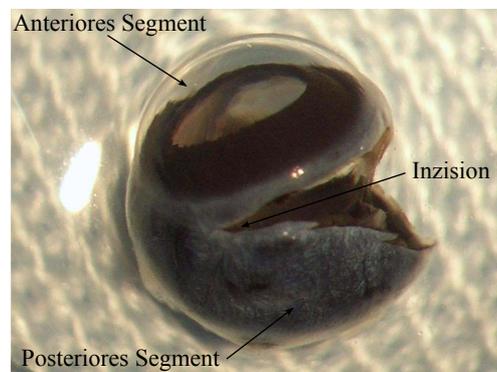
(a) Bulbus nach Entnahme



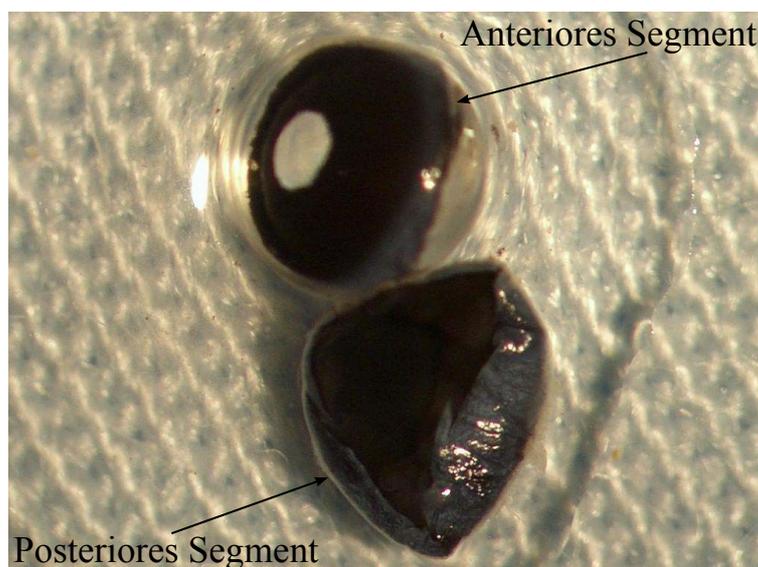
(b) Anhaftendes Muskel und Conjunktivalgewebe wurde entfernt



(c) Stichinzision

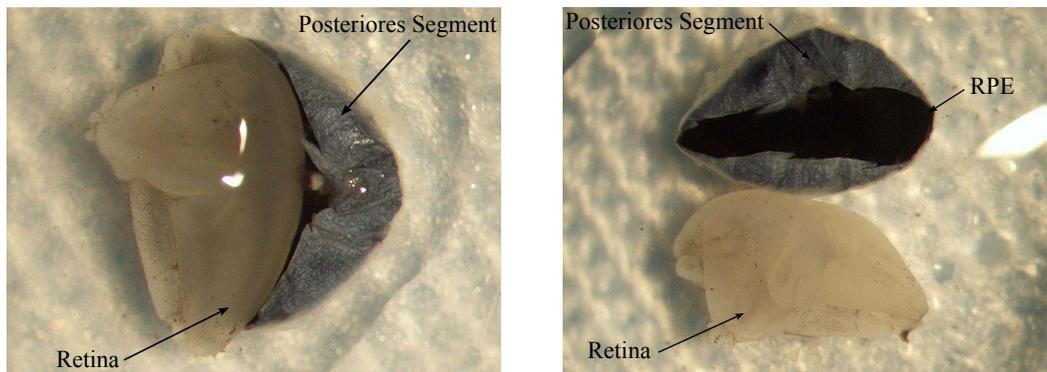


(d) Schnitt entlang der Ora serrata



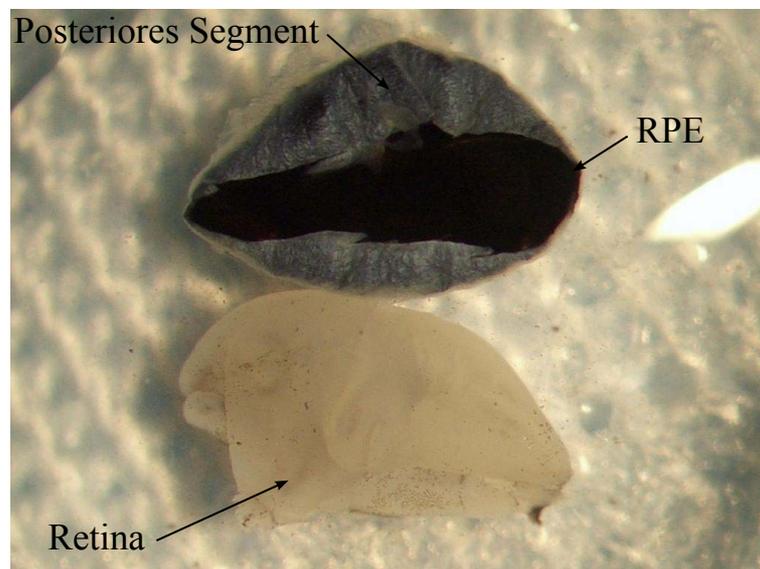
(e)

Abbildung 3.1: Entnahme und Präparation der Bulbi wie unter 3.3.1 Unterpunkt 1.-4. beschrieben



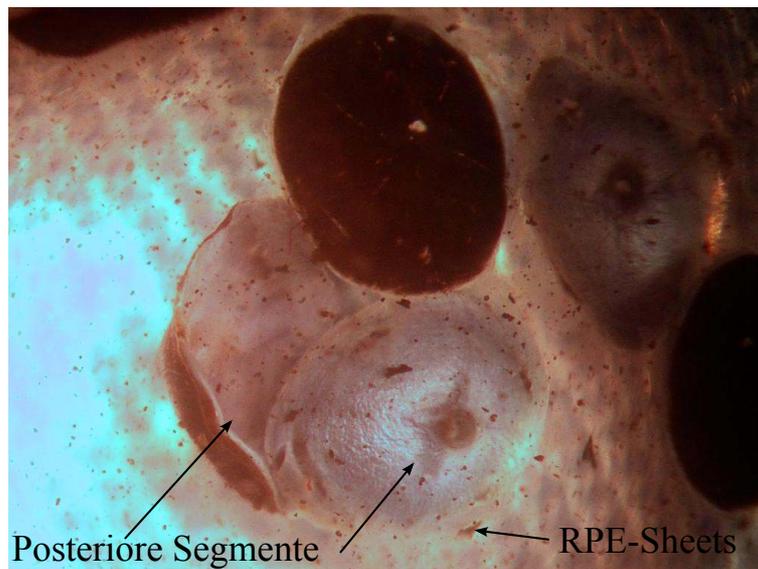
(a) Vorziehen der Retina

(b) Die Retina wurde entfernt

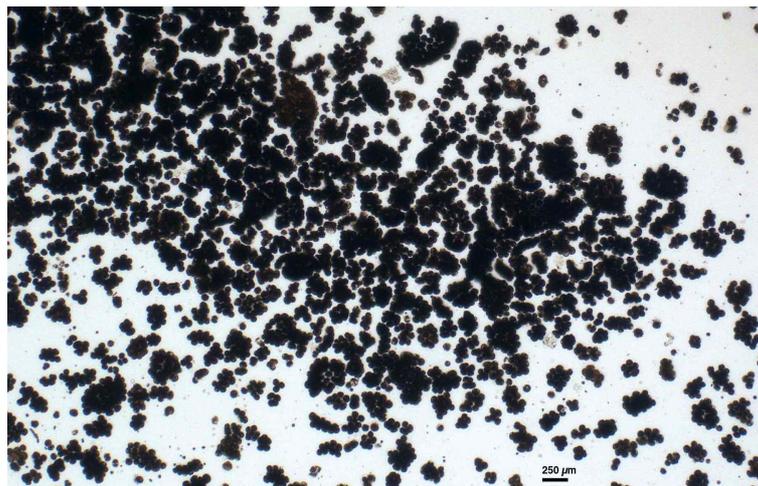


(c) Innenansicht des halbierten Bulbus nach Entfernung der Retina

Abbildung 3.2: Entnahme der Retina wie unter 3.3.1 Unterpunkt 7. beschrieben



(a) Nach Anspülen des Bulbus mit Flüssigkeitsimpulsen



(b) Aussaht 20 x vergrößert

Abbildung 3.3: Enzymatische Behandlung und Dissoziation des RPE-Gewebes wie unter 3.3.1 Unterpunkt 8.-15. beschrieben

### 3.3.2 Isolation von RPE-Sheets

#### Lösungen und Material

siehe 3.3.1

### **Entnahme und Präparation der Augen**

Die Entnahme und Präparation der Augen erfolgt wie unter 3.3.1 Unterpunkt 1.-4. beschrieben.

### **Vorbehandlung**

5. Der entstandene Augenbecher wird in 37° C warmes F99 transferiert und für 20 Minuten bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
6. Der Augenbecher wird in 500  $\mu$ l 37° C warmes PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) mit 1 mM EDTA überführt und für 28 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augennenseite des Augenbeckers nach oben.

### **Entfernung der Retina**

7. Der Augenbecher wird, mit der Innenseite nach oben zeigend, unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) platziert. Mit einer Pinzette wird die Retina gegriffen und vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Nervus Opticus umgeklappt. Der Nervus Opticus wird durchtrennt und die Retina entfernt.

### **Dissoziation des RPE-Gewebes**

8. Der Augenbecher wird in 100  $\mu$ l F99 überführt. Das Innere des Augenbeckers wird mit 20 $\mu$ l Flüssigkeitsimpulsen beschossen, dabei werden die RPE-Sheets aus dem Augenbecher herausgelöst.
9. Die RPE-Sheets werden mit F99 Zellkulturmedium in 14 ml Röhrchen überführt und bei 100 G für 3 Minuten runter zentrifugiert (Acceleration langsam 4, and Deceleration langsam 4).
10. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Zell-Pellet wird ad 100  $\mu$ l bis 300  $\mu$ l Zellkulturemedium resuspendiert und tropfenförmig in ein 24-Loch oder auf einen kleinen Glas Cover Slip ausgesät.
11. Nach zwei bis sechs Stunden wird das Deckglas vollständig mit F99-Zellkulturmedium bedeckt.

12. Die Zellen werden, sobald sie adhären sind, spätestens aber nach 24 Stunden eingesetzt.

### **3.3.3 Herstellung von primären RPE-Zellkulturen**

#### **Lösungen und Material**

siehe 3.3.1

#### **Entnahme und Präparation der Augen**

Die Entnahme und Präparation der Augen erfolgt wie unter 3.3.1 Unterpunkt 1.-4. beschrieben.

#### **Vorbehandlung**

Die Vorbehandlung der Bulbi erfolgt wie unter 3.3.1 Unterpunkt 5.-6. beschrieben.

#### **Entfernung der Retina**

Die Retina wird wie unter 3.3.1 Unterpunkt 7. beschrieben entfernt.

#### **Enzymatische Behandlung und Dissoziation des RPE-Gewebes**

Das RPE-Gewebe wird wie unter 3.3.1 Unterpunkt 8.-14. beschrieben enzymatisch behandelt und dissoziiert.

#### **Aussaat und Zellkultur**

15. 24 Stunden nach Aussaat werden zu den Kulturen vorsichtig 500  $\mu$ l Zellkulturmedium hinzu pipettiert.
16. 72 Stunden nach Aussaat wird der Überstand der Kulturen abgenommen und neu ausgesät.

17. Nach Abnahme des Überstandes werden die Kulturen mit PBS gespült und mit Medium aufgefüllt, dabei werden nicht adhärenente Zellen entfernt.
18. Das Zellkulturmedium wird dreimal pro Woche gewechselt.

### 3.3.4 Kriterien zur Bewertung des Isolationserfolges

Der Isolationserfolg des jeweiligen Protokolls wurde anhand von im Vorfeld durch mich aufgestellte Kriterien quantifiziert. Hierbei wurde eine Bewertung von null bis maximal fünf Punkte je Kriterium gegeben, welche mit unterschiedlicher Wertigkeit in das Gesamtergebnis gezählt wurden. Die jeweiligen verwendeten Kriterien variierten in Abhängigkeit des zu erzielenden Isolationsergebnisses. Die Bewertung erfolgte nach mikroskopischer Beurteilung des Isolationsproduktes.

#### **Verwendete Kriterien:**

- (a) Ausbeute
- (b) Reinheit
- (c) Morphologie
- (d) Anheftungsfähigkeit
- (e) Proliferationsfähigkeit

**Die Ausbeute** wurde nach Aussaat auf ein Glasdeckelchen abgeschätzt. Ein maximales Ergebnis von 5 Punkten wurde bei einer Bedeckung von 60 % des Glasdeckelchens vergeben. Ab 50 % Bedeckung wurden 4 Punkte, ab 40 % 3 Punkte, ab 30 % 2 Punkte, ab 20% 1 Punkt und darunter 0 Punkte vergeben.

**Die Reinheit** der Isolation wird bestimmt durch den Anteil von RPE-Zellen im Verhältnis zu Bindegewebe und Melanozyten. Sind nur RPE-Zellen sichtbar, wird die maximale Punktzahl von 5 Punkten vergeben. Das Vorhandensein von Binde- und oder Retinagewebe führt je nach Ausprägung zu einer Reduktion bis auf 3 Punkte. Bei dem mikroskopischen Nachweis von Melanozyten sinkt die maximal

zu vergebende Punktzahl auf 2 Punkte. Je nach Menge der Melanozyten werden 0-1 Punkte vergeben.

**Die Morphologie** der Zellen wird mikroskopisch beurteilt. Sind die Zellen zu 80 % ohne Schäden, polarisiert und mit mikroskopisch sichtbaren Mikrovilli, werden 5 Punkte vergeben. Bei 60 % der Zellen werden 4 Punkte, bei 50 % 3 Punkte, bei 40 % 2 Punkte, bei 20 % 1 Punkt und unter 20 % 0 Punkte vergeben.

**Die Anheftungsfähigkeit** wird 72 h nach Aussaat beurteilt, nachdem der Überstand der Kulturen abgenommen und die Kulturen gespült wurden, wie unter 3.3.3 beschrieben. Wenn nach dem Anspülen ca. 80 % der zuvor ausgesäten Zellen adhären sind, werden 5 Punkte vergeben. Bei 60 % Adhärenz werden 4, bei 50 % 3, bei 40 % 2, bei 20 % 1 und bei einer Adhärenz von weniger als 20 % 0 Punkte vergeben.

**Die Proliferationsfähigkeit** wird im Verlauf der Kultivierung beurteilt. Bei mikroskopisch sichtbaren Zellteilungsvorgängen bei 80 % der ausgesäten Zellen werden 5 Punkte vergeben, bei 60 % 4 Punkte, bei 50 % 3, bei 40 % 2, bei 20 % 1 und bei weniger als 20 % werden 0 Punkte vergeben. Die Unterergebnisse werden zu einem Gesamtergebnis addiert. Hierdurch besteht die Möglichkeit, die Resultate unterschiedlicher Techniken und Protokolle zu vergleichen. Die Unterergebnisse können in Abhängigkeit des zu isolierenden Produktes verdoppelt werden, um ihre Bedeutung hervorzuheben.

#### 3.3.4.1 Bewertungskriterien bei der Herstellung von Primärkulturen

1. Ausbeute 0-5 Punkte
2. Reinheit 0-5 Punkte  $\times$  2
3. Morphologie 0-5 Punkte
4. Anheftungsfähigkeit 0-5 Punkte

5. Proliferationsfähigkeit 0-5 Punkte  $\times$  2

Das Kriterium der Reinheit wurde doppelt gewertet aufgrund der Wichtigkeit für den Kulturerfolg durch die Gefahr von Kontamination. Ebenfalls doppelt gewertet wurde das Kriterium der Proliferationsfähigkeit, da diese essenziell für den Kulturerfolg ist. Bei der Bewertung der Herstellung von Primärkulturen können daher maximal 35 Punkte erzielt werden.

#### **3.3.4.2 Bewertungskriterien bei der Isolation von Einzelzellen**

1. Ausbeute 0-5 Punkte
2. Reinheit 0-5 Punkte
3. Morphologie 0-5 Punkte  $\times$  2

Bei der Bewertung der Isolation von Einzelzellen können maximal 20 Punkte vergeben werden. Das Kriterium der Morphologie wird doppelt gewertet, da dies entscheidend für die Eignung der Zellen für weitere Untersuchungen ist.

#### **3.3.4.3 Bewertungskriterien bei der Isolation von RPE-Sheets**

1. Ausbeute 0-5 Punkte
2. Reinheit 0-5 Punkte
3. Morphologie 0-5 Punkte  $\times$  2

Bei der Bewertung der Isolation von Einzelzellen können maximal 20 Punkte vergeben werden. Das Kriterium der Morphologie wird doppelt gewertet, da dies entscheidend für die Eignung der Zellen für weitere Untersuchungen ist.

## 3.4 Zellzählung

Die Zellen wachsen in einem mit Zellkulturmedium gefüllten Gefäß. Das Zellkulturmedium wird abgesaugt und das Kulturgefäß anschließend mit PBS gespült. Nachdem das PBS abgesaugt wurde wird 1 ml 0.05% Trypsinlösung in das Kulturgefäß gegeben und diese für ca. fünf Minuten im Brutschrank (Heraeus) bei 37.5°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. In dieser Zeit löst das Enzym die Zellverbindungen zwischen den einzelnen RPE-Zellen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Die entstandene Zellsuspension kann jetzt in ein 14 ml Röhrchen überführt und anschließend bei 100 G, Raumtemperatur und Beschleunigungs- und Verzögerungsstufe 9, fünf Minuten lang zentrifugiert werden. Der Überstand kann nun abgesaugt und der Zellrückstand anschließend ad 5 ml resuspendiert werden. Mit einer Cellsaverpipettenspitze werden 100  $\mu$ l aus der Zellsuspension abgenommen und in eine Neubauerkammer pipettiert. Unter einem Mikroskop können die einzelnen Quadrate der Neubauerkammer ausgezählt werden. Der sich errechnende Mittelwert pro Quadrat wird mit dem Faktor 10.000 multipliziert, woraus sich die Zellzahl pro ml in der Zellsuspension ergibt.

## 3.5 Analyse von RPE-Zellfunktionen

Als Bestandteil dieser Arbeit wurden zwei Methoden an den Isolationsprodukten erprobt, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

### 3.5.1 Immuncytochemische Färbungen

Bei der Immuncytochemie binden primäre Antikörper an definierte Strukturen einer Zelle. Nach Zugabe eines mit einem fluoreszierenden Molekül gekoppelten sekundären Antikörpers geht dieser eine Bindung mit dem primären Antikörper ein. Das fluoreszierende Molekül absorbiert die Wellenenergie des Lichts eines definierten Wellenspektrums und emittiert die aufgenommene Energie in Form von Licht mit einer höheren Wellenlänge als das zuvor absorbierte Licht. Das emittierte Licht wird dann mithilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops dargestellt und

photographisch dokumentiert.

### 3.5.1.1 Färbungsprotokoll

Die RPE-Zellen werden nach dem unter 3.3 beschriebenen Protokoll isoliert und die RPE-Zellausbeute zweier Bulbi auf einem in acht Kompartimente unterteilten Objektträger ausgesät und bei 37,5°C und 5 % CO<sub>2</sub> bis zur Konfluenz in einem Brutschrank inkubiert. Zur immuncytochemischen Färbung werden die Kompartimentierungen der Objektträger entfernt. Wenn nicht anders angegeben, werden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Objektträger werden mit PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und die Zellen durch Eintauchen der Objektträger für 10 Minuten in -20°C kaltem Methanol fixiert. Im Anschluss werden die Objektträger zweimal in PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Hiernach werden die Objektträger fünf Minuten lang in PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und 0,5 % Triton X-100 inkubiert. Danach erfolgen zwei erneute Waschungen in PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) für jeweils zwei Minuten. Im Anschluss werden die Zellen auf den Objektträger 10 Minuten in einer Blockierlösung aus PBS mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und 0,5 % Ziegen Serum blockiert.

Im nächsten Schritt werden 250  $\mu$ l einer im Verhältnis 1:50 mit dem Primärantikörper verdünnten Blockierlösung (PBS mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und 0,5 % Ziegen Serum auf Parafilm pipettiert. Die Objektträger werden mit der Zellseite nach unten auf die Lösung gelegt und 30 Minuten inkubiert.

Anschließend werden die Objektträger zweimal zwei Minuten lang in PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und danach für weitere 30 Minuten in einer Lösung aus PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) und dem Sekundärantikörper, im Verhältnis Antikörper zu PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) von 1:500, im Dunkeln inkubiert.

Die Objektträger werden dann zweimal fünf Minuten in PBS (mit Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gewaschen und im Anschluss kurz mit Aqua dest und danach mit Ethanol abgespült.

Danach werden die Objektträger in 30-40  $\mu$ l Dako-Eindeckelmedium pro Deckgläschen eingedeckelt. Die Objektträger härten nun im Dunkeln für ca. 30 Minuten aus und werden im Dunkeln aufbewahrt. Die Fluoreszenz ist etwa vier Wochen lang

sichtbar.

### 3.5.2 Methode der transepithelialen Widerstandsmessung an Kulturzellen

Die Methode der Messung des transepithelialen Widerstands (TER) nach dem Ohmschen Gesetz dient der Beschreibung der Barrierefunktion einer Zellschicht. Hierbei wird eine Spannung  $U$  zwischen zwei Elektroden angelegt, wobei sich die Elektroden auf unterschiedlichen Seiten der Zellschicht befinden. Der Stromfluss  $I$  wird gemessen und führt nach dem Ohmschen Gesetz  $R = \frac{U}{I}$  zu dem elektrischen Widerstand  $R$ . Die RPE-Zellen werden nach dem Protokoll zur Herstellung von RPE-Zellkulturen 3.3.3 isoliert und die RPE-Zellen auf einen Filtereinsatz mit einer Porengröße von  $0,4 \mu m$  und einem Durchmesser von  $12 \text{ mm}$  mit  $100 \mu l$  Zellkulturmedium ausgesät. Es wurde jeweils die Ausbeute eines Bulbus auf zwei Filtereinsätze verteilt. Die Kulturen wurden dann wie unter 3.3.3 beschrieben kultiviert. Abbildung 3.4 zeigt eine schematische Darstellung der Kultivierung von RPE-Zellen auf Filtereinsätzen. Zwei Kulturschalenvertiefungen und deren Filtereinsätze wurden zur späteren Bestimmung der Leerwerte lediglich mit Medium befüllt. Der transepitheliale Widerstand (TER) wurde mit Hilfe eines Millicell-ERS Volt-Ohm-Meter der Firma Millipore auf einer Sterilbank gemessen. Abbildung 3.5 zeigt ein Schema des Versuchsaufbaus. 20 Minuten vor der Messung wurden die Zellkulturschalen aus dem Inkubator genommen um zu gewährleisten, dass die TER-Messung bei Raumtemperatur stattfinden. Es wurde dann der Leerwert bestimmt, indem der TER beider Leer-Kulturen gemessen, miteinander addiert und durch zwei geteilt wurde. Der errechnete Leerwert wurde von den gemessenen TER-Werten der Filterkulturen subtrahiert und auf die effektive Filterfläche ( $0,6 \text{ cm}^2$ ) berechnet.

Beispielrechnung:

$$R_{Kultur} - R_{Leer} = R_{Zellmonolayer}$$

$$R_{Kultur} = 200 \Omega$$

$$R_{Leer} = 100 \Omega$$

$$200 \Omega - 100 \Omega = 100 \Omega$$

$$100 \Omega \times 0,6 \text{ cm}^2 = 60 \Omega \times \text{cm}^2$$

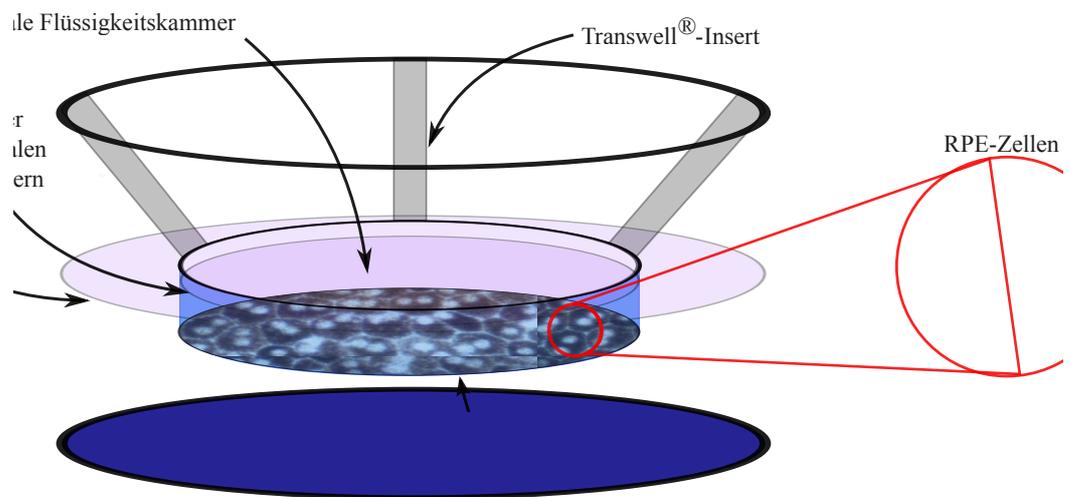


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Kultur von RPE-Zellen auf Filtereinsätzen

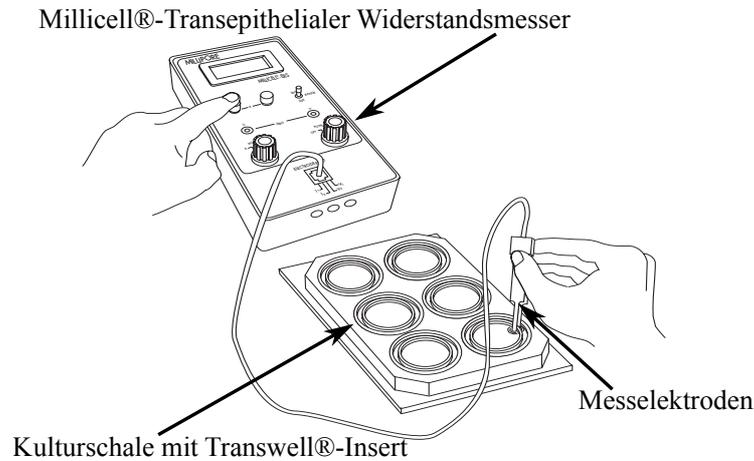


Abbildung 3.5: Versuchsaufbau zur TER-Messung modifiziert nach Millicell®-ERS user Guide 9/99

### 3.5.2.1 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit der Software Prism der Frima GraphPad auf einem iMac durchgeführt. Die Standardabweichung wurde aus der Analyse von sechs Experimenten errechnet. Bei dem Vergleich von TER-Werten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ), dass die gefundenen Unterschiede bei Gültigkeit der Nullhypothese aufgetreten wären, mit One-Way ANOVA und dem Tukey multiple Vergleichstest berechnet.

# Kapitel 4

## Ergebnisse

### 4.1 Entwicklung der Isolationsprotokolle

Die in dieser Arbeit entwickelten Isolationsprotokolle stellen eine Modifikation der bisher beschriebenen Methoden dar. Um diese Protokolle zu entwickeln, wurden die entnommenen murinen Augen vorbehandelt, mechanisch präpariert und enzymatisch behandelt.

#### 4.1.1 Vorbehandlung

Es wurden zwei unterschiedliche Vorbehandlungsmethoden angewandt:

1. Vorbehandlung vor der Entfernung des anterioren Segments
2. Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Segments

Die Bulbi wurden wie unter 3.3.1 beschrieben entnommen und präpariert. Verglichen wurden die Isolationsergebnisse der Bulbi, welche eine Vorbehandlung vor Entfernung des anterioren Augensegmentes erhalten hatten mit denen der Bulbi, welche nach der Entfernung des anterioren Augensegmentes eine Vorbehandlung bekommen hatten. Kriterien zur Evaluation der Methoden waren die erzielte Zel-

lausbeute, ob sich die Retina leicht und ohne Zellverlust entfernen ließ, sowie der unter dem Mikroskop beobachtete Zustand der isolierten Zellen.

Abbildung 4.1 stellt die verschiedenen angewendeten Ansätze graphisch zusammen.

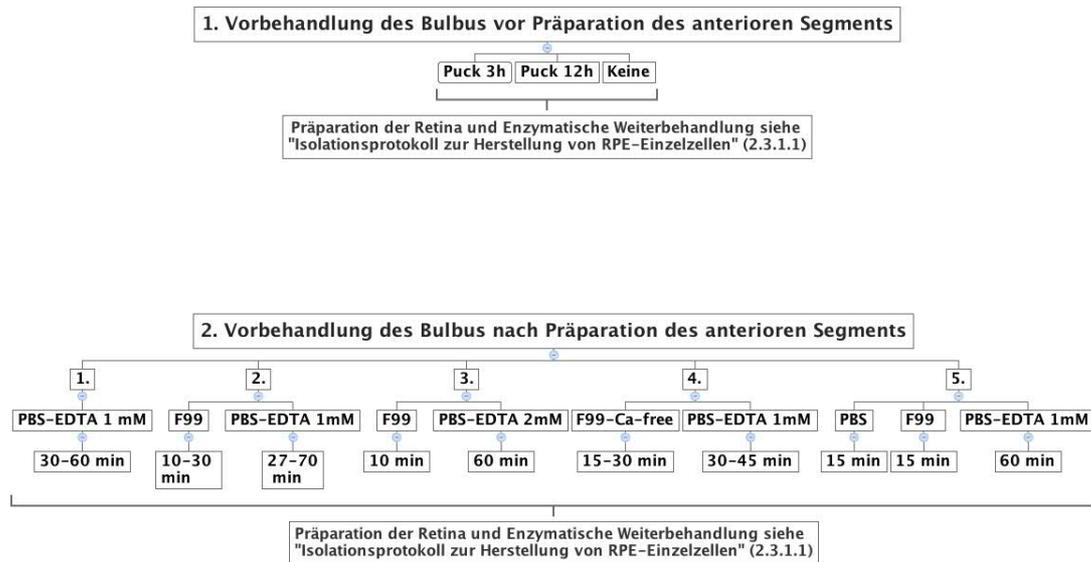


Abbildung 4.1: Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung der Bulbi vor und nach Präparation des anterioren Augensegmentes

#### 4.1.1.1 Vorbehandlung vor der Entfernung des anterioren Augensegmentes

Nach der unter Punkt 3.3.1 beschriebenen Entnahme der Bulbi wurden diese in einem mit Puckscher Lösung gefülltem 10 ml Röhrchen bei 37° C inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde dabei variiert. Die Tabelle 4.1 zeigt die Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung vor Entfernung des anterioren Augensegmentes. Eine Tabelle mit Auflistung aller Ansätze befindet sich im Anhang unter 6.1.

Tabelle 4.1: Übersichtstabelle zur Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung vor Entfernung des anterioren Augensegmentes mit einer Flüssigkeit

Substanz	Dauer
Pucksche Lösung	3-18h

Nach Abschluss der Vorbehandlung wurden die Bulbi, wie unter 3.3.1 erklärt, präpariert und weiter verarbeitet.

#### 4.1.1.2 Vorbehandlung nach der Entfernung des anterioren Augensegmentes

Nach der unter Punkt 3.3.1 beschriebenen Präparation der Bulbi wurden diese unter Zuhilfenahme einer Pinzette in eine mit 500  $\mu$ l Flüssigkeit gefüllte Kavität einer 24-Lochschale überführt und bei 37° C inkubiert. Sowohl die Art der Flüssigkeit, die Inkubationsdauer als auch die Kombination der Substanzen wurden hierbei variiert. Die Übersichtstabellen 4.2 bis 4.4 zeigen die unterschiedlichen Ansätze. Eine vollständige Auflistung aller Ansätze findet sich im Anhang unter 6.2 bis 6.4.

Tabelle 4.2: Übersichtstabelle zur Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit einer Flüssigkeit

Substanz	Konzentration	Dauer
PBS EDTA	1 mM	30-60 min

Tabelle 4.3: Übersichtstabelle zur Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit der Kombination aus zwei Flüssigkeiten

Substanz 1	Dauer	Substanz 2	Konzentration	Dauer
F99	10-30 min	PBS-EDTA	1-2 mM	30-70 min
F99 Ca-frei	15-30 min	PBS EDTA	1 mM	30-45 min

Tabelle 4.4: Übersichtstabelle zur Gruppierung der Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit der Kombination aus drei Flüssigkeiten

Substanz	Dauer	Substanz 2	Dauer	Substanz 3	Konzentration	Dauer
PBS	15 min	F99	15 min	PBS EDTA	1 mM	60 min

#### 4.1.1.3 Zusammenfassung

Die Vorbehandlung nach Entfernen des anterioren Segmentes erzielte durch die direkte Applikation der Vorbehandlung die besten Isolationsergebnisse in Bezug auf Ausbeute und Kulturfähigkeit der isolierten RPE-Zellen. Auch ließ sich die Retina ohne großen Widerstand vom RPE-Gewebe abheben.

Die Inkubation von 37°C warmen F99 über 15 Minuten in Kombination mit PBS EDTA in einer Konzentration von 1 mM bei einer Inkubationszeit von 40 Minuten bei 37° zeigte die besten Isolationsergebnisse in Bezug auf die oben genannten Kriterien. Abbildung 4.6 zeigt die Ausbeute eines solchen Ansatzes. Zusammenfassend konnten folgende Schritte für das Isolationsprotokoll etabliert werden:

1. Der Augenbecher wird wie unter 3.3 beschrieben präpariert und in 37° C warmes F99 transferiert und für 15 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
2. Der Augenbecher wird in 500  $\mu$ l 37° C warmes PBS (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>) mit 1 mM EDTA überführt und für 40 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augeninnenseite des Augenbechers nach oben.

Die mikroskopische Bewertung nach den unter 3.3.4.1 festgelegten Kriterien ergab die unter 4.2 bis 4.3 aufgeführten Ergebnisse. Hierbei zeigten sich die unter 4.1.1.3 aufgeführten Schritte nach Entfernung des anterioren Segments als deutlich überlegen mit einem Isolationscore von durchschnittlich 16,2 Punkten.

Bei der Verwendung einer Konzentration von PBS-EDTA von 2 mM zeigten die isolierten Zellen mikroskopisch erkennbare Zellschäden in Form von Blasenbildung, wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist und auch der Kulturerfolg konnte sich nicht einstellen.

Die Vorbehandlung in Puckscher Lösung vor der Präparation des Bulbus und Entfernung der Retina zeigte einen sehr niedrigen Isolationsscore von 4,8 Punkten, siehe 4.2 und erbrachte keinen erkennbaren Vorteil für die Isolationsprotokolle. Bei der Präparation der Retina haftete ein großer Teil der RPE-Zellen an der Retina wie in Abbildung 4.7 dargestellt. Es konnte außerdem keine suffiziente Zellausbeute erreicht werden, wie in Abbildung 4.6 dargestellt und ein Kulturerfolg konnte ebenfalls nicht erreicht werden.

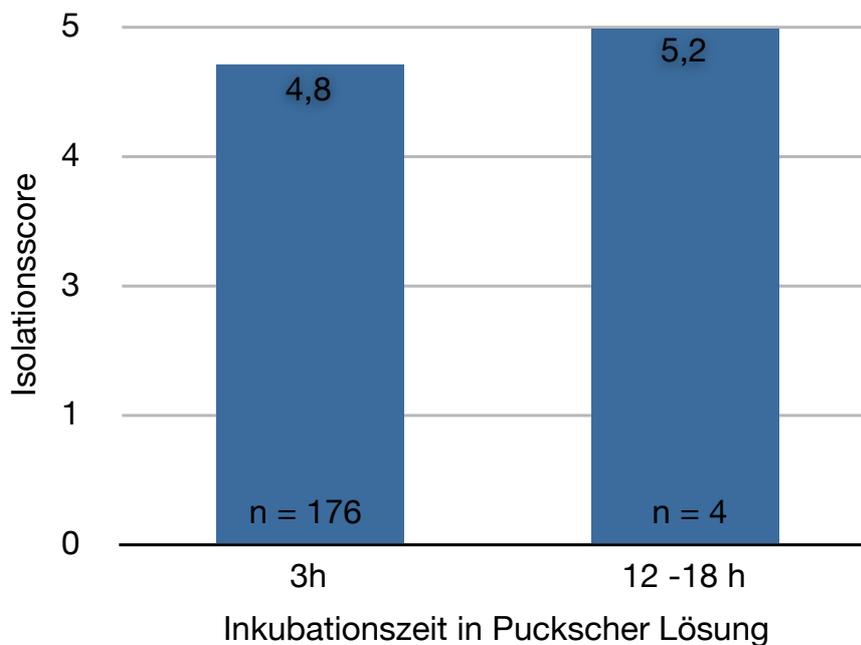


Abbildung 4.2: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore bei der Inkubation der Bulbi für 8 h und 12 -18 h in Puckscher Lösung vor der Entfernung des anterioren Segments (Maximaler Score = 35)

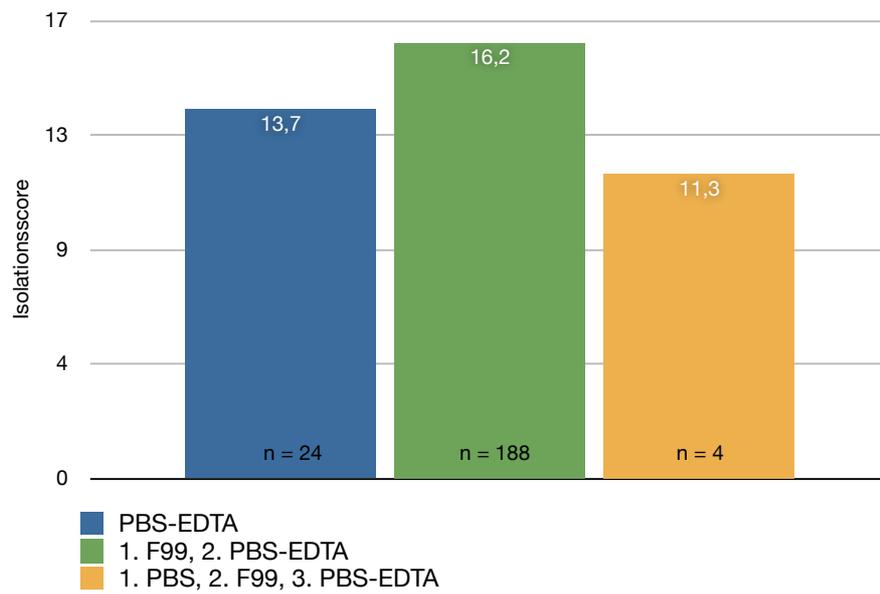
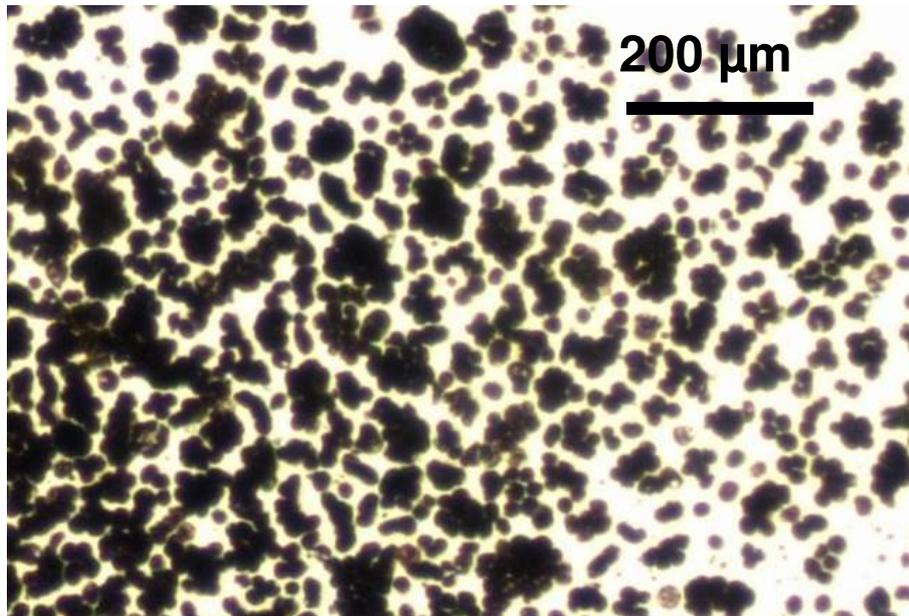
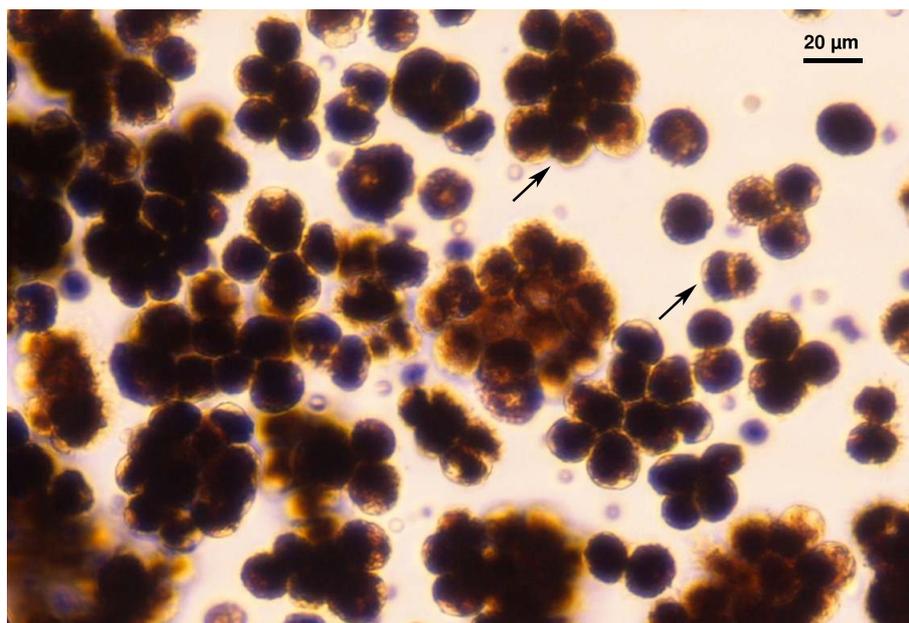


Abbildung 4.3: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore für unterschiedliche Ansätze der Vorbehandlung der Bulbi nach der Entfernung des anterioren Segments (Maximaler Score = 35)

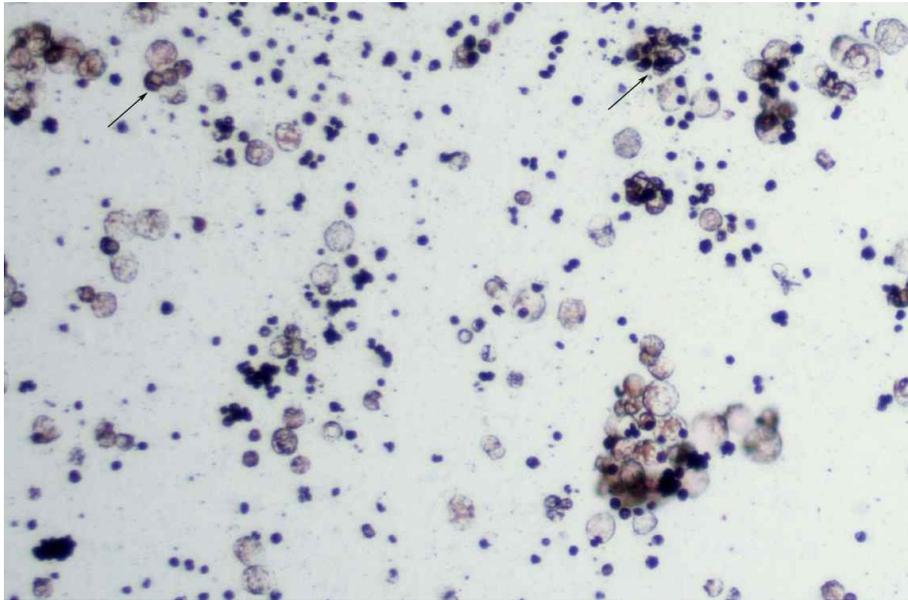


(a) RPE-Zellen 20 × vergrößert



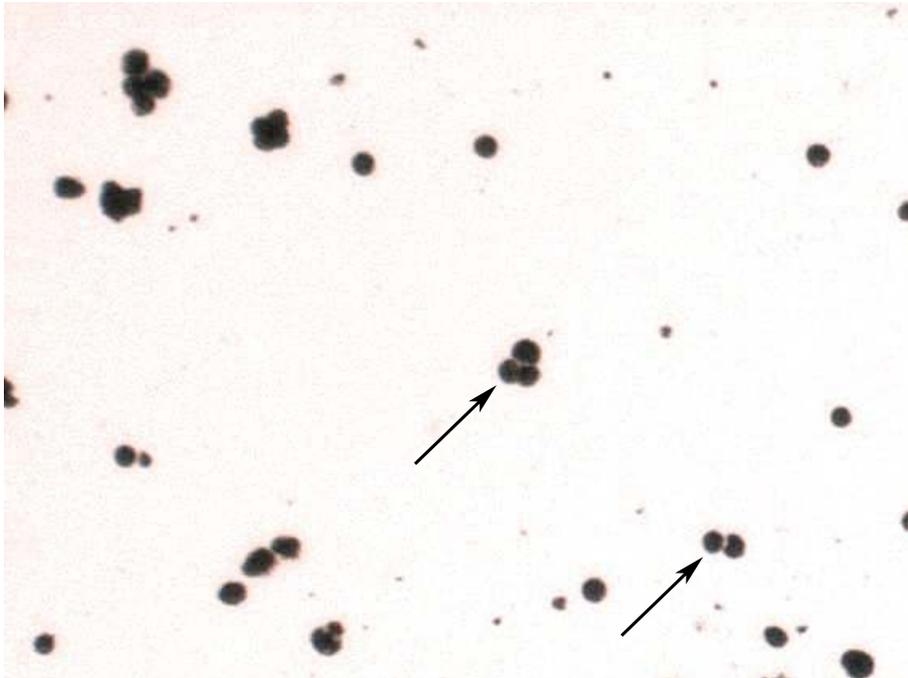
(b) ↗ = RPE-Zellen, 100 x vergrößert

Abbildung 4.4: (a) und (b) zeigen die Zellausbeute nach Vorbehandlung mit F99 und PBS-EDTA 1 mM nachdem das anteriore Segment entfernt worden ist



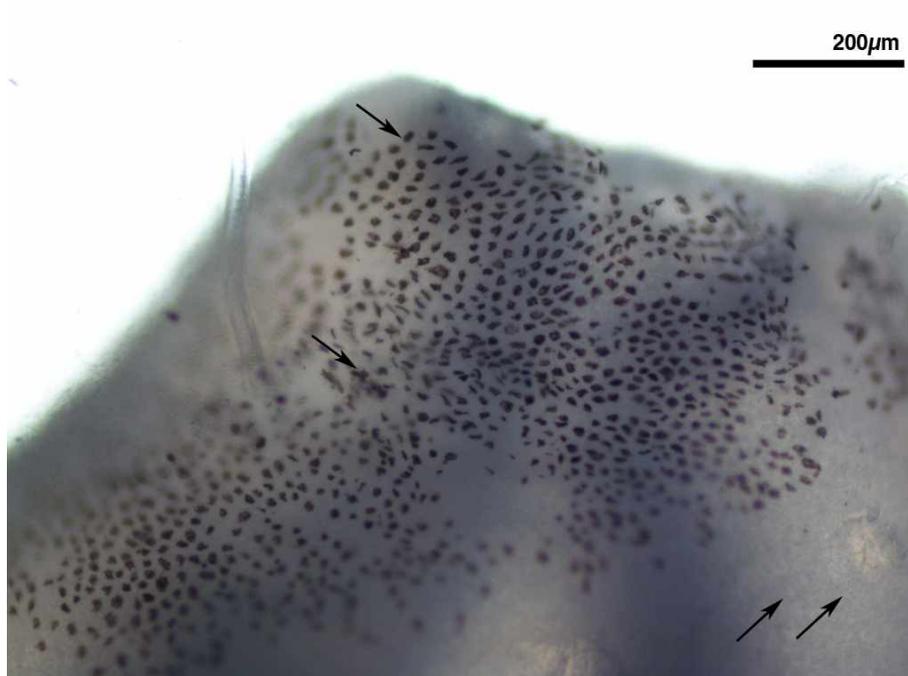
(a) ↗ = Zellen mit Blasenbildung

Abbildung 4.5: Blasenbildung bei RPE-Zellen unmittelbar nach der Isolation bei der PBS-EDTA in einer Konzentration von 2 mM zur Vorbehandlung verwendet wurde



(a) ↗ = RPE-Zellen

Abbildung 4.6: Ausbeute nach Vorbehandlung mit Puckscher Lösung vor Entfernung des anterioren Augensegments



(a) Retinales Gewebe ↗, mit RPE-Zellgewebe ↘

Abbildung 4.7: Die Retina wurde entfernt nachdem der Bulbus vor Entfernung des anterioren Augensegments drei Stunden mit Puckscher Lösung vorbehandelt worden ist

### 4.1.2 Mechanische Manipulation

Um RPE-Zellen zu isolieren ist es notwendig, das Gewebe einer gewissen Form der mechanischen Manipulation zu unterziehen, um sowohl die Verbindungen der RPE-Zellen mit der Retina als auch untereinander zu lösen. Dabei ist das Ziel, die traumatischen Einflüsse für die Zellen so gering wie möglich zu halten und dabei die größt mögliche Ausbeute zu erhalten. Die Bulbi wurden wie unter 3.3 erklärt präpariert und die Retinae entfernt. Bei der mechanischen Manipulation zur Ablösung des RPE wurden drei Techniken angewandt und miteinander verglichen:

1. Abschaben des RPE-Gewebes mit der abgerundeten Seite eines Skalpell
2. Die vorbehandelten Bulbi wurden mit einer silikonisierten Pipettenspitze in

einem definierten Flüssigkeitsvolumen titriert

3. Die vorbehandelten Bulbi wurden mit Hilfe einer 100  $\mu\text{l}$  Pipette mehrmals mit 20  $\mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpulsen angespült

#### 4.1.2.1 Abschaben des RPE-Gewebes

Das Auge wurde, mit der Innenseite nach oben zeigend, unter einem Dissektionsmikroskop platziert. Mit einer Pinzette wurde der Bulbus fixiert, während mit einem Skalpell die Bulbusinnenseite in vier gleich große Teile eingeritzt wurde. Im Anschluss wurde das RPE-Gewebe vorsichtig von innen nach außen mit einem abgerundeten Skalpell abgeschabt. Das RPE-Gewebe wurde mit einer silikonisierten Pipettenspitze aufgenommen und der weiteren Behandlung zugeführt.

#### 4.1.2.2 Titration des Bulbus

Der Bulbus wurde in ein definiertes Flüssigkeitsvolumen von 500  $\mu\text{l}$  umgesetzt und mit einer silikonisierten Pipettenspitze und einer 1 ml Pipette in die Pipettenspitze eingezogen und sofort danach wieder ausgetrieben. Dieser Vorgang wird 20 mal wiederholt. Diese Pipettenspitze hat eine spezielle Beschichtung aus Silikon, welche die Adhäsion von Zellen verringert, und eine vergrößerte Öffnung, sodass die traumatischen Effekte beim Austreibungsvorgang der Titration verringert werden.

#### 4.1.2.3 Gezieltes Anspülen des Bulbus

Der Bulbus wurde in ein definiertes Flüssigkeitsvolumen von 355  $\mu\text{l}$  gesetzt und mit 20  $\mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpulsen aus einer 100  $\mu\text{l}$  Pipette sechsmal anpulsiert. Hierdurch konnten gerichtete Flüssigkeitsimpulse punktuell auf das vorbehandelte RPE-Gewebe im Bulbus appliziert werden, ohne dass direkter Kontakt zur Pipettenspitze oder einer anderen Oberfläche nötig ist. Der Bulbus flotierte dabei frei in der Flüssigkeit, wodurch Abscherungen des Bulbus an der Gefäßoberfläche verhindert werden können. Auf diese Weise wird der traumatische Effekt auf das RPE-Gewebe, bei zugleich ausreichender Kraftapplikation, minimalisiert. Die auf diese Weise isolierten

Zellen zeigen die günstigen, unter 3.3.4.2 aufgeführten morphologischen Kriterien in Bezug auf Polarisierung der Zellen, intakte Mikrovilli und Anzeichen für Zellschäden.

#### 4.1.2.4 Zusammenfassung

Das gezielte Anspülen des Bulbus erbrachte die besten Resultate. Sowohl die Zellausbeute pro Bulbus als auch der Zustand der Zellen sowie deren Fähigkeit, nach weiterer Behandlung unter Kulturbedingungen zu proliferieren, und die Reinheit der entstandenen Kulturen erfüllten die Erwartungen. Der Isolationsscore, nach den unter 3.3.4.1 festgelegten Kriterien, war mit 23,7 Punkten den anderen Ansätzen deutlich überlegen, siehe 4.8. Folgende Schritte konnten zur Ergänzung des Isolationsprotokolls hinzugefügt werden:

1. Der Augenbecher wird in eine 24-Loch Kulturschale mit 355  $\mu\text{l}$  Dissoziationspuffer (875  $\mu\text{l}$  PBS-EDTA + 115  $\mu\text{l}$  L-Cys-Solution + 10  $\mu\text{l}$  BSA) umgesetzt.
2. Das Innere des Augenbechers wird 6 mal mit einem 20  $\mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpuls beschossen, dabei wird das RPE aus dem Augenbecher herausgelöst. Hierzu wird eine 100  $\mu\text{l}$  Pipette und 120  $\mu\text{l}$  zusätzlicher Dissoziationspuffer verwendet. Der Augenbecher wird verworfen.

Das Abschaben des RPE-Gewebes erwies sich als ungeeignet. Die entstandenen Gewebestücke waren zu groß um enzymatisch gleichmäßig weiter prozessiert zu werden. Die durch Abschabungen oder Titration isolierten Zellen wiesen außerdem zu einem Großteil mikroskopisch erkennbare Zellschäden auf und waren nur zu einem sehr geringen Teil in der Lage, in Kultur zu proliferieren und zeigten keine Polarisierung oder intakte Mikrovilli. Somit erfüllten die Zellen nicht die unter 3.3.4.2 aufgestellten Kriterien, was sich in einem durchschnittlichen Isolationsscore von 7,9 Punkten widerspiegelt. Häufig waren diese Kulturen durch Melanozyten verunreinigt, siehe Abbildung 4.9 a und b.

Die Titration der Bulbi mit Hilfe einer Cell-Saver-Pipettenspitze erfüllte die Anforderungen an eine sanfte Gewebseparation nicht. Bei zu geringem Titrationsaufwand war die Zellausbeute nicht suffizient, bei zu hohem zeigte die mikroskopische

Betrachtung zahlreiche Zellschäden. Des Weiteren waren die mit hohem Titrationsaufwand gewonnenen Zelllösungen durchsetzt von großen Gewebsakkumulaten, deren enzymatische Weiterbehandlung nicht möglich war. Die so isolierten RPE-Zellen erfüllten aufgrund der Zellschäden nicht die unter 3.3.4.2 aufgestellten Kriterien mit einem Durchschnittsscore von 8,8 Punkten.

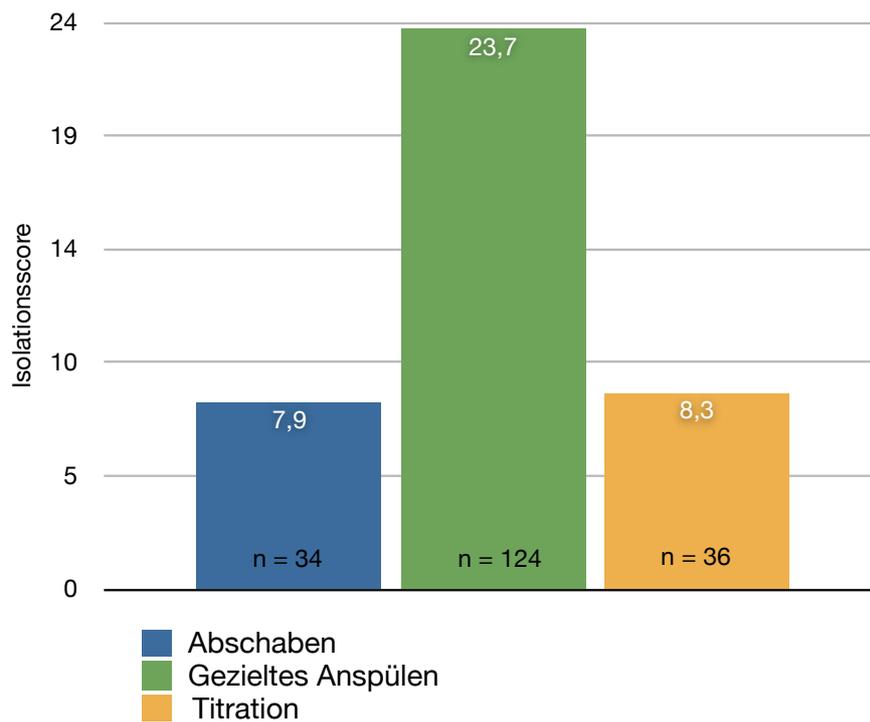
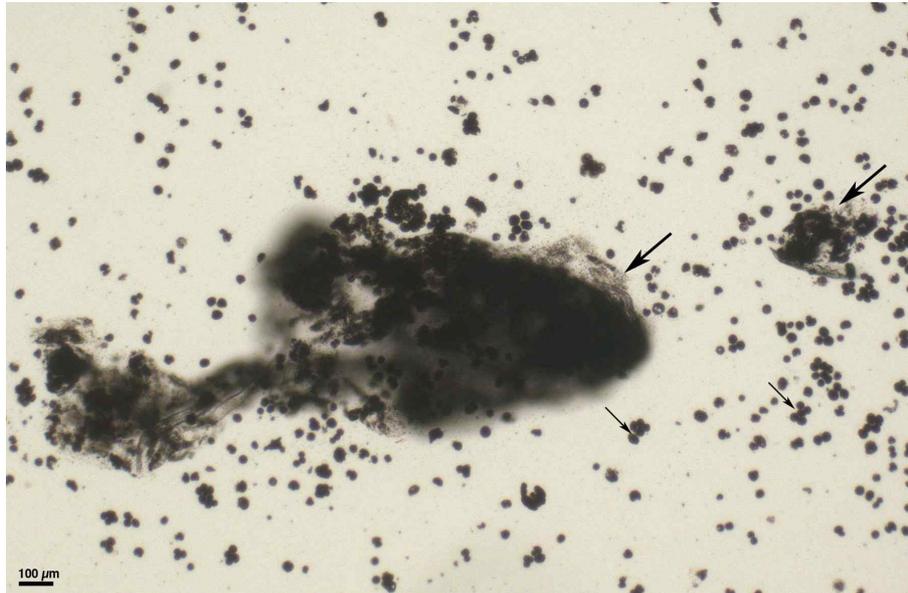
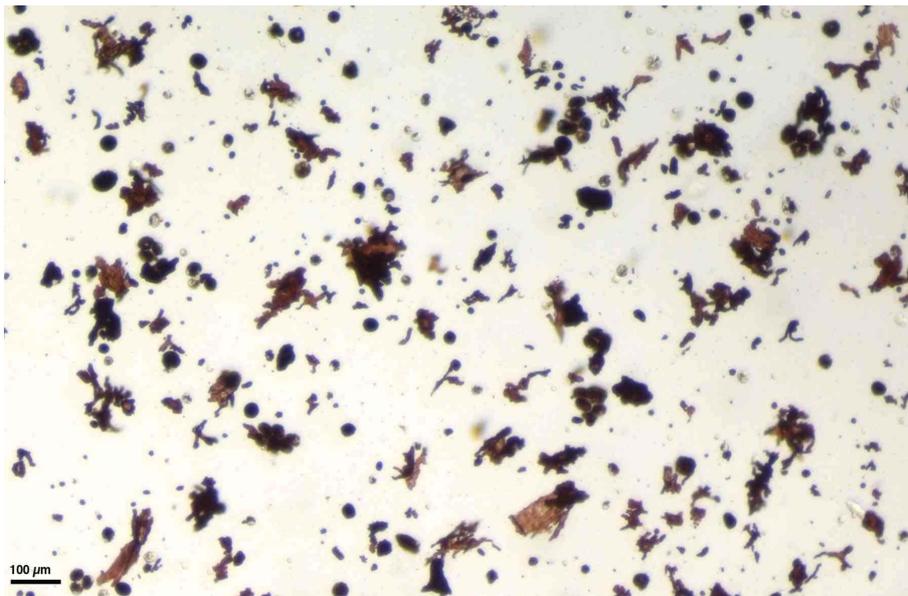


Abbildung 4.8: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore der verschiedenen Ansätze der mechanischen Manipulation bei der Isolation von RPE-Zellen (Maximaler Score = 35)



(a) Gewebebrocken = /, RPE-Zellen = \



(b) Melanozyten = /, RPE-Zellen = \

Abbildung 4.9: (a) und (b) zeigen Verunreinigungen in Form von Gewebebrocken (a), welche beim Abschaben mit einem runden Skalpell im Rahmen des Isolationsprozesses entstanden sind und Melanozyten (b), welche bei der Titration mit einer silikonisierten Pipettenspitze im Rahmen des Isolationsprozesses mit isoliert wurden

### 4.1.3 Enzymatische Behandlung

Um die Zellverbindungen der RPE-Zellen im Zellverband zu lockern und die Effekte der mechanischen Manipulation zu maximieren, werden diese vor der mechanischen Manipulation enzymatisch behandelt. Hierbei war es von großer Bedeutung, die RPE-Zellen nicht zu großem Stress auszusetzen, um die Funktions- sowie Überlebensfähigkeit der Zellen zu gewährleisten. Zur Bewertung der Enzyme sowie zur Auswahl der Konzentrationen und Expositionszeiten wurde die Fähigkeit zur Separation des Gewebes, der mikroskopische Zustand der Zellen, die Proliferationsfähigkeit der Zellen und der Kulturerfolg herangezogen.

Es wurden folgende Enzyme in verschiedenen Konzentrationen, Expositionszeiten und Kombinationen im Protokoll eingesetzt und verglichen:

1. Papain siehe Tabelle 3.1
2. Trypsin siehe Tabelle 3.1
3. Collagenase siehe Tabelle 3.1
4. Acutase siehe Tabelle 3.1
5. Dispase siehe Tabelle 3.1

Bei der enzymatischen Behandlung wurden drei unterschiedliche Ansätze angewandt und verglichen. Diese sind in der Abbildung 4.10 dargestellt.



Abbildung 4.10: Gruppierung der Ansätze zur enzymatischen Weiterbehandlung

#### 4.1.3.1 Enzymatische Behandlung vor Präparation der Retina

Die Bulbi wurden wie unter Punkt 3.3 beschrieben entnommen und präpariert. Im Anschluss wurden die Augenbecher mit einer Pinzette in eine, mit einer Enzymlösung gefüllte Kavität einer 24-Lochschale überführt und bei 37° C inkubiert.

Hierbei wurden die Enzyme, deren Konzentration und die Inkubationsdauer variiert. Abbildung 4.11 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Ansätze. Die Tabelle 4.5 fasst die verwendeten Ansätze zusammen. Eine vollständige Auflistung findet sich im Anhang unter 6.5 bis 6.9.

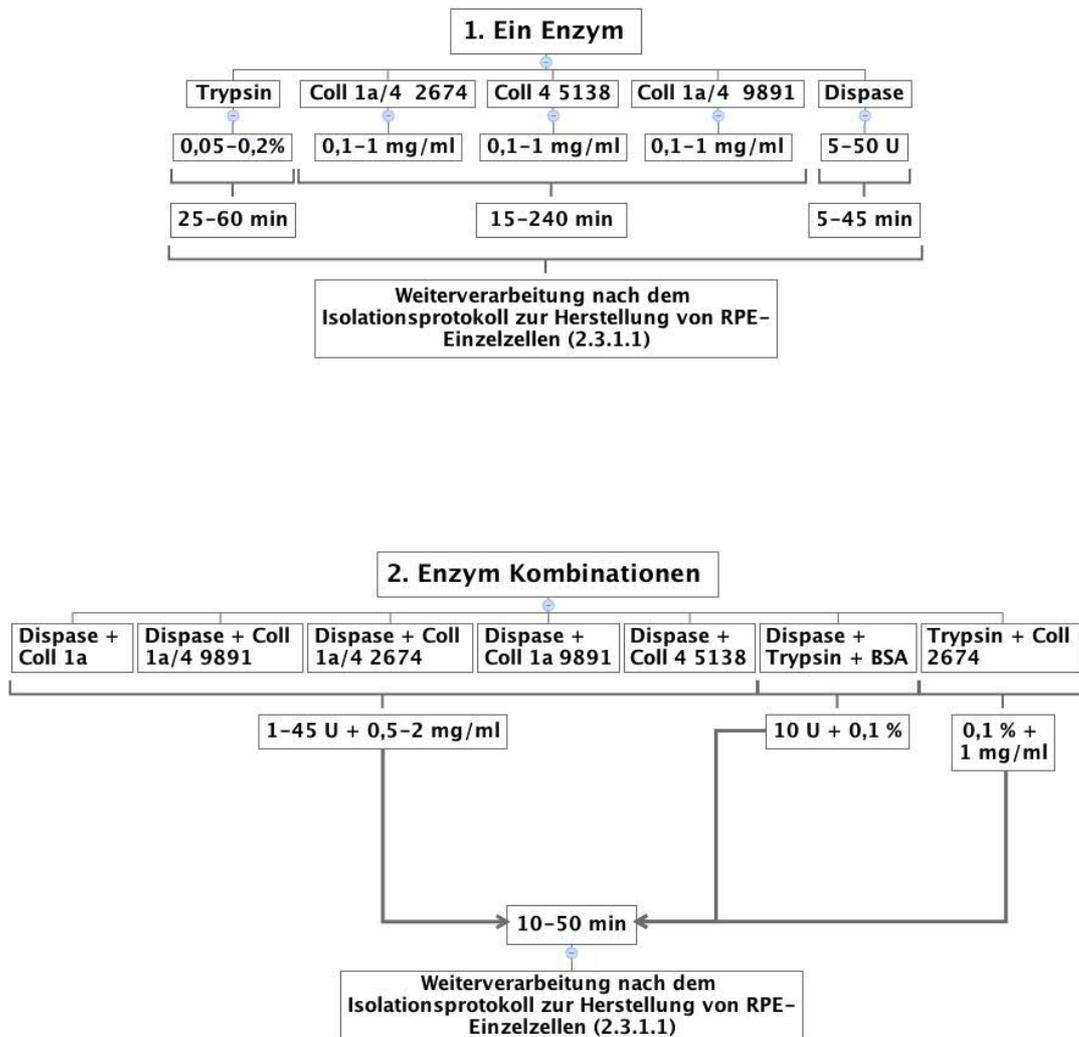


Abbildung 4.11: Gruppierung der Ansätze zur enzymatischen Weiterbehandlung vor Präparation der Retina mit einem Enzym oder mit einer Enzymkombination

Tabelle 4.5: Übersichtstabelle zu 4.1.3.1

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus
Collagenase	0.1-1 mg/ml	15-240 min	250-500 $\mu$ l
Collagenase + Trypsin	1 mg/ml + 0,1	30 min	500 $\mu$ l
Dispase	5-50 U	10-20 min	500 $\mu$ l
Dispase + Collagenase	1-45U + 0,5-1mg/ml	10-50 min	250-500 $\mu$ l
Dispase + Trypsin	10 + 0,1 %	30 min	500 $\mu$ l
Papain	1-5 U	10 min	500 $\mu$ l
Trypsin	0,05-0,2 %	40-105 min	250-1000 $\mu$ l

#### 4.1.3.2 Enzymatische Behandlung nach Entfernung der Retina

Nach Präparation und Entfernung der Retina wie unter 3.3 beschrieben wurden die Augenbecher mit einer Pinzette in eine mit einer Enzymlösung gefüllte Kavität einer 24-Lochschale überführt und bei 37° C inkubiert. Hierbei wurden die Enzyme, deren Konzentration und die Inkubationsdauer variiert. Die Abbildung 4.12 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Ansätze. Die Tabelle 4.6 fasst die verwendeten Ansätze zusammen. Eine vollständige Auflistung findet sich im Anhang unter 6.10 bis 6.11.

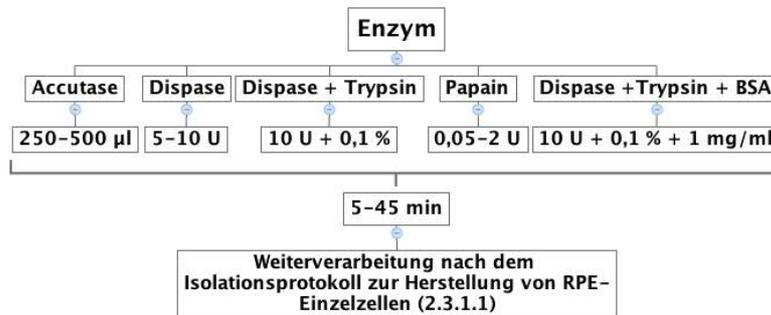


Abbildung 4.12: Gruppierung der Ansätze zur enzymatischen Behandlung nach Präparation der Retina

Tabelle 4.6: Übersichtstabelle zu 4.1.3.2

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus
Accutase	250-500 $\mu\text{l}$	5-10 min	500 $\mu\text{l}$
Dispase	5-10 U	10-20 min	500 $\mu\text{l}$
Dispase + Trypsin	10 U + 0,1 %	25 + 30 min	500 $\mu\text{l}$
Papainpuffer	0,1-2 U	5-45 min	500-1000 $\mu\text{l}$

#### 4.1.3.3 Enzymatische Behandlung vor und nach Entfernung der Retina

Nach Entnahme und Präparation der Bulbi wie unter 3.3 beschrieben wurden die Augenbecher mit einer Pinzette in eine mit einer Enzymlösung gefüllte Kavität einer 24-Lochschale überführt und bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde die Retina wie unter 3.3 aufgeführt entfernt. Der Augenbecher wurde danach in eine, mit einer Enzymlösung gefüllte Kavität einer 24-Lochschale überführt und bei 37°C inkubiert. Hierbei wurden die Enzyme, deren Konzentration und die Inkubationsdauer variiert.

Die Abbildung 4.13 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten Ansätze. Die Tabelle 4.7 fasst die verwendeten Ansätze zusammen. Eine vollständige Auflis-

stung findet sich im Anhang unter 6.12.

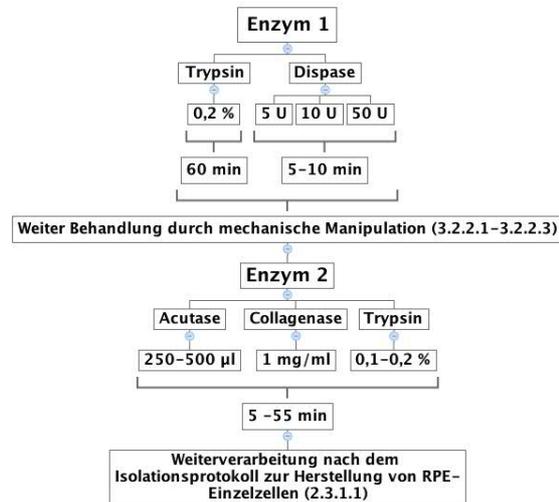


Abbildung 4.13: Gruppierung der Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor und nach Präparation der Retina

Tabelle 4.7: Übersichtstabelle zu 4.1.3.3

Enzym 1	Konzentration	Dauer	Enzym 2	Konzentration	Dauer
Dispase	5-50 U	5-10 min	Accutase	10	5-20 min
Dispase	10 U	25-45 min	Trypsin	0,1 % - 0,2 %	5-30 min
Trypsin	0,2 %	60 min	Collagenase	1 mg/ml	10-55 min

#### 4.1.3.4 Zusammenfassung

Es zeigte sich, dass die Inkubation der herausgelösten RPE-Zellverbände in einem Papainpuffer über einen Zeitraum von 15 Minuten die besten Isolationsergebnisse in Bezug auf die Separation des RPE-Gewebes, den mikroskopischen Zustand der Zellen und die Proliferationsfähigkeit der Zellen im Verlauf der Zellkultur zeigte. Der durchschnittlich erreichte Isolationscore dieses Ansatzes, nach den unter 3.3.4.2 festgelegten Kriterien, betrug 27,3 Punkte, siehe Abbildung 4.15. Abbildun-

gen 4.17 bis 4.19 zeigen exemplarisch die gewonnenen Isolationsprodukte. Durch die Anwendung der übrigen Ansätze mit den Enzymen Accutase, Collagenase, Dispase, Papain und Trypsin in unterschiedlichen Konzentrationen und Expositionzeiten, die unter 4.1.3.1 und 4.1.3.3 beschrieben sind, konnten maximale Isolationscores von 14,1 Punkten, siehe Abbildung 4.14 und 14,6 Punkten, siehe Abbildung 4.16 erzielt werden.

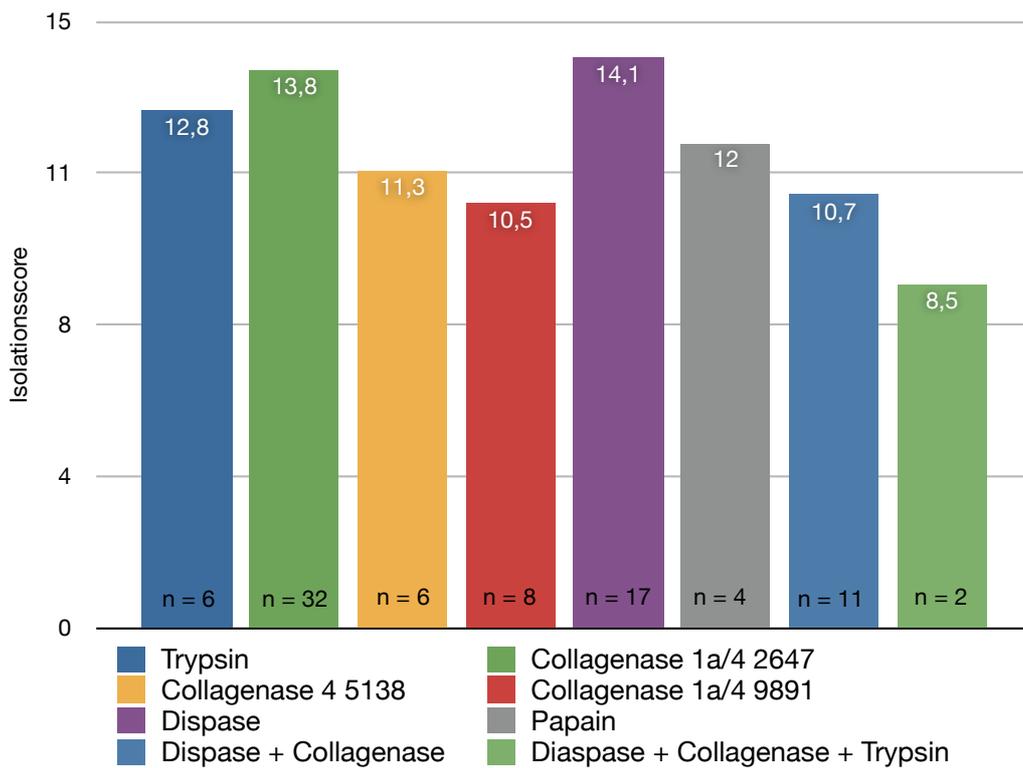


Abbildung 4.14: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore der verschiedenen Ansätze der enzymatischen Behandlung vor der Entfernung der Retina bei der Isolation von RPE-Zellen (Maximaler Score = 35)

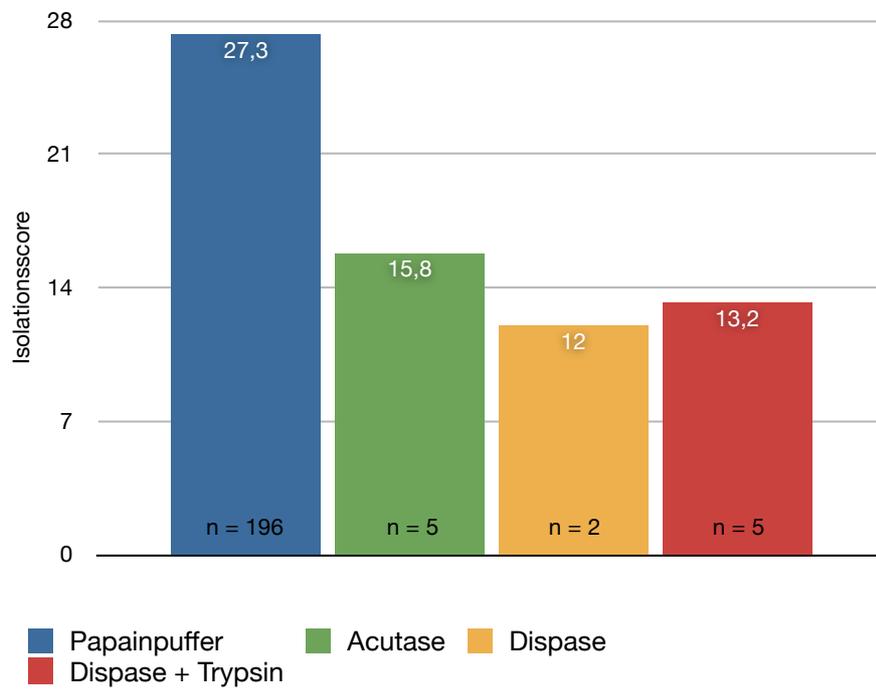


Abbildung 4.15: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore der verschiedenen Ansätze der enzymatischen Behandlung nach der Entfernung der Retina bei der Isolation von RPE-Zellen (Maximaler Score = 35)

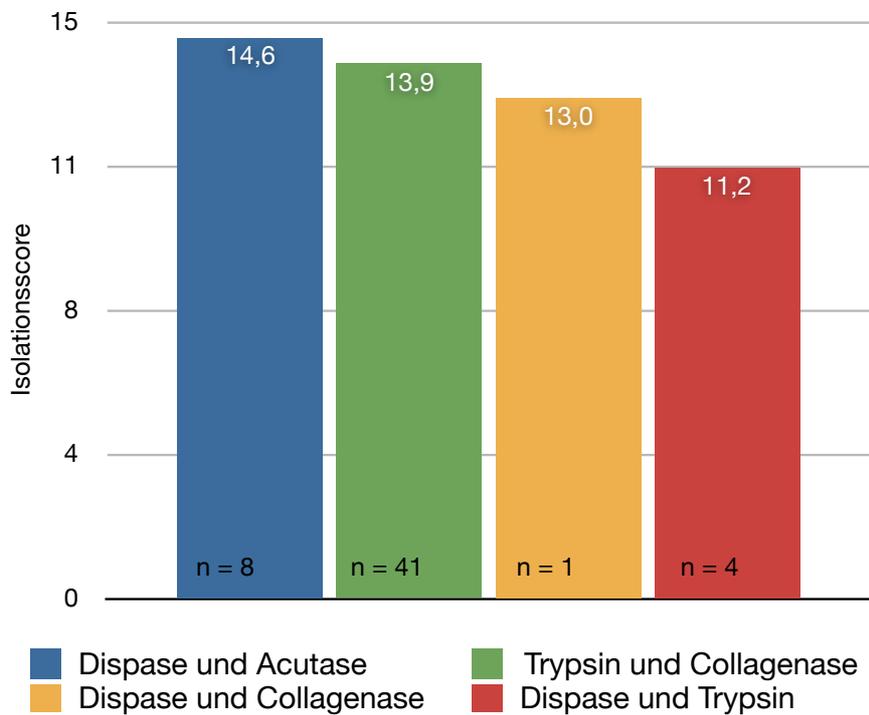


Abbildung 4.16: Durchschnittlich erreichter Isolationsscore der verschiedenen Ansätze der enzymatischen Behandlung vor und nach der Entfernung der Retina bei der Isolation von RPE-Zellen (Maximaler Score = 35)

Zusammenfassend wurde folgendes Isolationsprotokoll etabliert:

#### Protokoll zur Isolation von RPE-Einzelnzellen

1. Die Versuchstiere werden mit Diethylether anästhesiert und durch cervicale Dislokation getötet (Deklaration von Helsinki).
2. Zur Augenentnahme wird eine gebogene Pinzette vorsichtig gegen Ober- und Unterseite des Auges gedrückt, sodass beide Schenkel hinter das Auge gleiten. Die Pinzette wird um den Nervus opticus zusammengedrückt und angehoben, dabei reißen Muskel- und Nervengewebe. Das Auge wird entnommen und in PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) überführt.

3. Das Auge wird in einer Petrischale unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer kleinen Schere und einer Pinzette werden Muskel- und Conjunktivalgewebe gründlich abpräpariert. Dabei wird das Auge konstant mit PBS feucht gehalten.
4. Mit einer feinen Kanüle wird dorsal der Ora Serrata ein Loch in den Bulbus gestochen. In das Loch wird der Schenkel einer kleinen Schere eingeführt und das Auge circumferentiell aufgeschnitten. Das anteriore Segment mit Hornhaut, Ziliarkörper, Linse und Glaskörper wird entfernt.
5. Der entstandene Augenbecher wird in  $37^\circ\text{C}$  warmes F99 transferiert und für 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
6. Der Augenbecher wird in  $500\ \mu\text{l}$   $37^\circ\text{C}$  warmes PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit 1 mM EDTA überführt und für 40 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augeninnenseite des Augenbechers nach oben.
7. Der Augenbecher wird, mit der Innenseite nach oben zeigend, unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer Pinzette wird die Retina gegriffen und vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Nervus opticus umgeklappt. Die Retina sollte vollständig vom RPE gelöst sein und es sollten sich keine RPE-Sheets an der Retina befinden. Der Nervus opticus wird durchtrennt und die Retina entfernt.
8. Der Augenbecher wird in eine 24-Loch Kulturschale mit  $355\ \mu\text{l}$  Dissoziationspuffer ( $875\ \mu\text{l}$  PBS-EDTA +  $115\ \mu\text{l}$  L-Cys-Solution +  $10\ \mu\text{l}$  BSA) umgesetzt.
9. Das Innere des Augenbechers wird 6 mal mit einem  $20\ \mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpuls beschossen, dabei wird das RPE aus dem Augenbecher herausgelöst. Hierzu wird eine  $100\ \mu\text{l}$  Pipette und  $120\ \mu\text{l}$  zusätzlicher Dissoziationspuffer verwendet. Der Augenbecher wird verworfen.

10. Zu der Zellsuspension werden 25  $\mu\text{l}$  aktiviertes Papain (Papain, Sigma P3125, 18 U/mg, 26 mg/ml), gelöst in 500  $\mu\text{l}$  Dissoziationspuffer und einer Konzentration von 2 U hinzu pipettiert. Dadurch entsteht ein Endvolumen von 500  $\mu\text{l}$  (355  $\mu\text{l}$  + 6 x 20  $\mu\text{l}$  + 25  $\mu\text{l}$ ) und eine Endkonzentration von 0,1 U. Die Suspension wird für 15 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Lösung wird in ein 14 ml Röhrchen überführt und bei 100 G für 3 Minuten herunter zentrifugiert (Acceleration langsam 4, and Deceleration langsam 4).
12. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Zu dem Zellpellet werden 5  $\mu\text{l}$  (=5  $\mu\text{g}$ ) Fibronectin hinzugefügt.
13. Das Zellpellet wird ad 100  $\mu\text{l}$  Zellkulturremedium resuspendiert und tropfenförmig in ein 24-Loch oder auf einen kleinen Glas-Cover-Slip ausgesät. Zur besseren Zelladhäsion wird die jeweilige Oberfläche vorher mit 5  $\mu\text{l}$  Fibronectin bedeckt und luftgetrocknet.
14. Die Zellen werden, sobald sie adhären sind, spätestens aber nach 24 Stunden eingesetzt.

Bei der Durchführung der Experimente zeigte sich, dass bei Weglassen der enzymatischen Behandlung und geringfügigen Änderungen der Inkubationszeiten in F99 und PBS-EDTA, die Änderungen zur Isolation von RPE-Zellverbänden mit mehr als 100 Zellen pro Zellverband mit erhaltener hexagonaler und epithelialer Struktur führten (RPE-Sheets). Diese RPE-Gewebe ermöglichen die Anwendung von Funktionsuntersuchungen an intakten, frisch isolierten RPE-Zellverbänden. Abbildungen 4.19 a-c zeigen diese Isolationsprodukte. Folgendes Protokoll konnte für die Isolation von RPE-Sheets etabliert werden:

#### **Protokoll zur Isolation von RPE-Sheets**

1. Die Versuchstiere werden mit Diethylether anästhesiert und durch cervicale Dislokation getötet (Deklaration von Helsinki).

2. Zur Augenentnahme wird eine gebogene Pinzette vorsichtig gegen Ober- und Unterseite des Auges gedrückt, so dass beide Schenkel hinter das Auge gleiten. Die Pinzette wird um den Nervus opticus zusammengedrückt und angehoben, dabei reißen Muskel- und Nervengewebe. Das Auge wird entnommen und in PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) überführt.
3. Das Auge wird in einer Petrischale unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer kleinen Schere und einer Pinzette werden Muskel- und Conjunktivalgewebe gründlich abpräpariert. Dabei wird das Auge konstant mit PBS feucht gehalten.
4. Mit einer feinen Kanüle wird dorsal der Ora Serrata ein Loch in den Bulbus gestochen. In das Loch wird der Schenkel einer kleinen Schere eingeführt und das Auge circumferentiell aufgeschnitten. Das anteriore Segment mit Hornhaut, Ziliarkörper, Linse und Glaskörper wird entfernt.
5. Der entstandene Augenbecher wird in  $37^\circ\text{C}$  warmes F99 transferiert und für 20 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
6. Der Augenbecher wird in  $500\ \mu\text{l}$   $37^\circ\text{C}$  warmes PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit 1 mM EDTA überführt und für 28 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augeninnenseite des Augenbechers nach oben.
7. Der Augenbecher wird, mit der Innenseite nach oben zeigend, unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer Pinzette wird die Retina gegriffen und vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Nervus opticus umgeklappt. Die Retina sollte vollständig vom RPE gelöst sein und es sollten sich keine RPE-Sheets an der Retina befinden. Der Nervus opticus wird durchtrennt und die Retina entfernt.
8. Der Augenbecher wird in  $100\ \mu\text{l}$  F99 Zellkulturmedium überführt. Das Innere des Augenbechers wird mit  $20\ \mu\text{l}$  Flüssigkeitsimpulsen beschossen, dabei werden die RPE-Sheets aus dem Augenbecher herausgelöst.

9. Die RPE-Sheets werden mit F99 Zellkulturmedium in 14 ml Röhrchen überführt und bei 100 *G* für 3 Minuten runter zentrifugiert (Acceleration langsam 4, und Deceleration langsam 4)
10. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wird ad 100  $\mu$ l bis 300  $\mu$ l Zellkulturmedium resuspendiert und tropfenförmig in eine 24-Loch oder auf einem kleinen Glas-Cover-Slip ausgesät.
11. Nach zwei bis sechs Stunden wird das Deckglas vollständig mit F99-Zellkulturmedium bedeckt.

Die mikroskopische Bewertung nach den unter 3.3.4.3 festgelegten Kriterien ergab für das Protokoll 4.1.3.4 einen durchschnittlichen Isolationsscore von 15,9 Punkten bei einem Maximalwert von 20 Punkten (n=25).

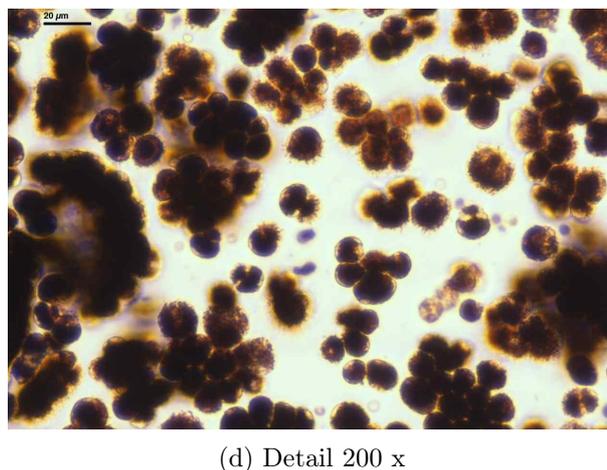
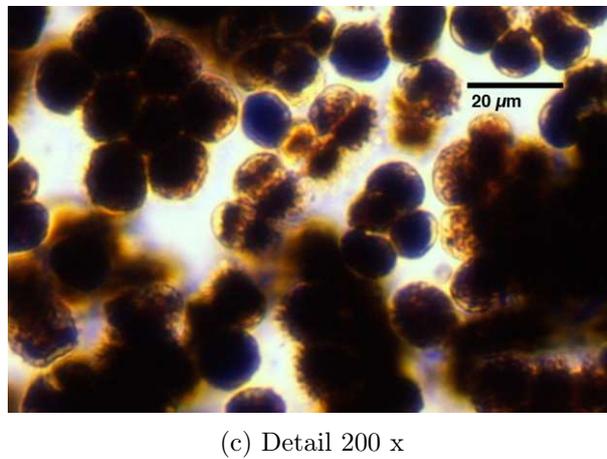
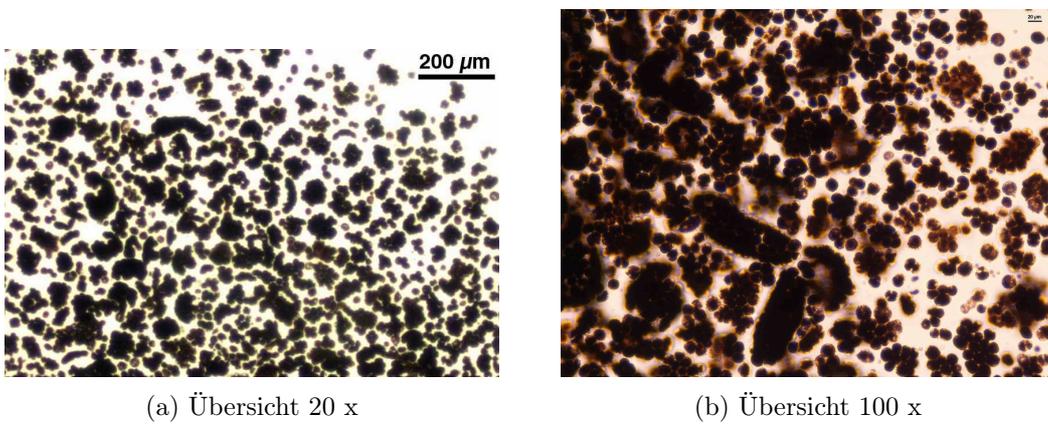
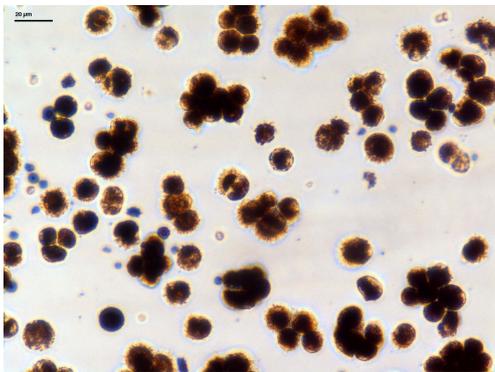
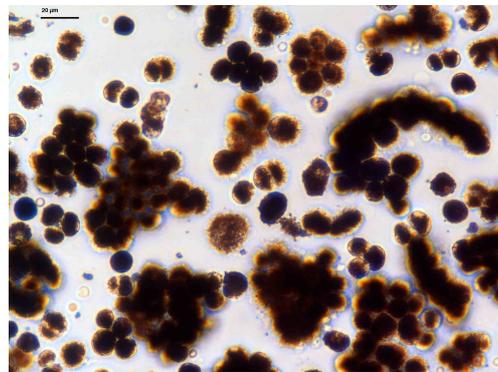


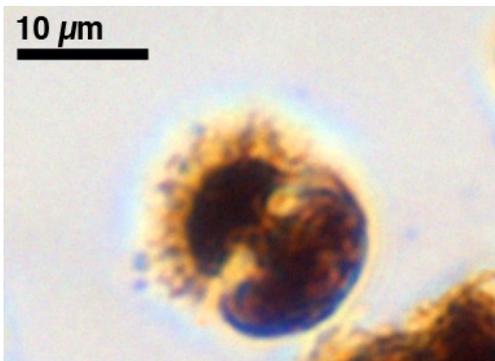
Abbildung 4.17: Zellausbeute von RPE-Einzelzellen, welche nach dem unter Punkt 4.1.3.4 beschriebenen Protokoll zur Isolation von RPE-Einzelzellen isoliert worden sind, bei unterschiedlichen Vergrößerungen.



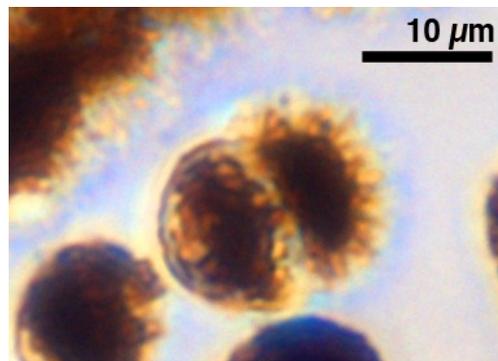
(a) Übersicht 100 x



(b) Übersicht 100 x

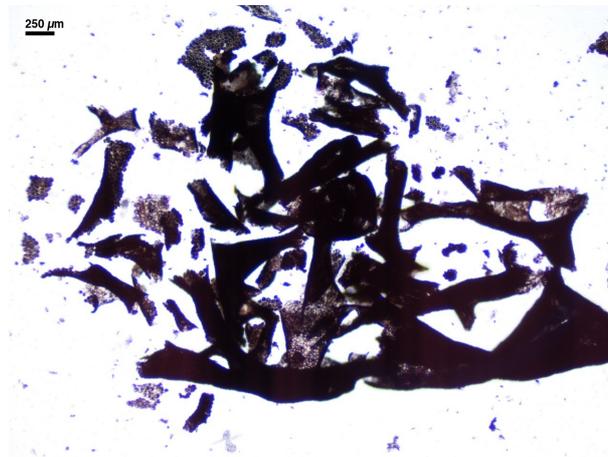


(c) Detail 200 x



(d) Detail 200 x

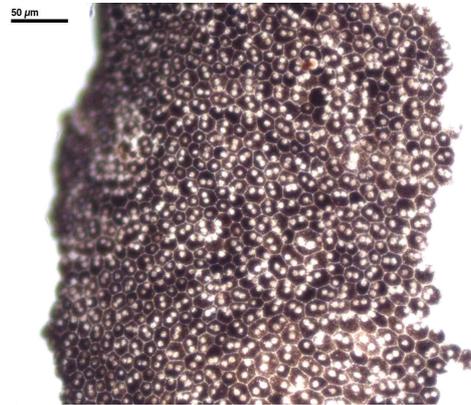
Abbildung 4.18: RPE-Einzelzellen, welche nach dem unter Punkt 4.1.3.4 beschriebenen Protokoll zur Isolation von RPE-Einzelzellen isoliert worden sind, bei unterschiedlichen Vergrößerungen



(a) Übersicht 20 x



(b) Übersicht 100 x



(c) Detail 100 x

Abbildung 4.19: a-c RPE-Sheets, isoliert nach dem unter 4.1.3.4 beschriebenen Isolationsprotokoll zur Isolation von RPE-Sheets, bei unterschiedlichen Vergrößerungen.

## 4.2 Zellkultur

In der Zellkultur wurden die nach dem unter Punkt 3.3.1 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von RPE-Zellkulturen gewonnenen RPE-Zellen ausgesät und wie unter Punkt 3.3.3 beschrieben kultiviert. Es wurde die Ausbeute der Isolation eines Auges auf die Fläche eines Wells in einer 24-Lochschale ausgesät. Nach drei Tagen begannen die Zellen zu proliferieren und verloren dabei im weiteren Verlauf einen

Teil ihres Melanins.

Folgendes Protokoll zur Herstellung von primären RPE-Zellkulturen konnte etabliert werden.

### **Herstellung von primären RPE-Zellkulturen**

1. Die Versuchstiere werden mit Diethylether anästhesiert und durch cervicale Dislokation getötet (Deklaration von Helsinki).
2. Zur Augenentnahme wird eine gebogenen Pinzette vorsichtig gegen Ober- und Unterseite des Auges gedrückt, so dass beide Schenkel hinter das Auge gleiten. Die Pinzette wird um den Nervus opticus zusammengedrückt und angehoben, dabei reißen Muskel- und Nervengewebe. Das Auge wird entnommen und in PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) überführt.
3. Das Auge wird in einer Petrischale unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) platziert. Mit einer kleinen Schere und einer Pinzette werden Muskel- und Conjunktivalgewebe gründlich abpräpariert. Dabei wird das Auge konstant mit PBS feucht gehalten.
4. Mit einer feinen Kanüle wird dorsal der Ora serrata ein Loch in den Bulbus gestochen. In das Loch wird der Schenkel einer kleinen Schere eingeführt und das Auge circumferentiell aufgeschnitten. Das anteriore Segment mit Hornhaut, Ziliarkörper, Linse und Glaskörper wird entfernt.
5. Der entstandene Augenbecher wird in  $37^\circ\text{C}$  warmes F99 transferiert und für 15 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert.
6. Der Augenbecher wird in  $500\ \mu\text{l}$   $37^\circ\text{C}$  warmes PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) mit 1 mM EDTA überführt und für 40 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in einem Zellkulturinkubator inkubiert. Dabei zeigt die Augeninnenseite des Augenbeckers nach oben.
7. Der Augenbecher wird, mit der Innenseite nach oben zeigend, unter einem Dissektionsmikroskop in einem Flüssigkeitstropfen PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und

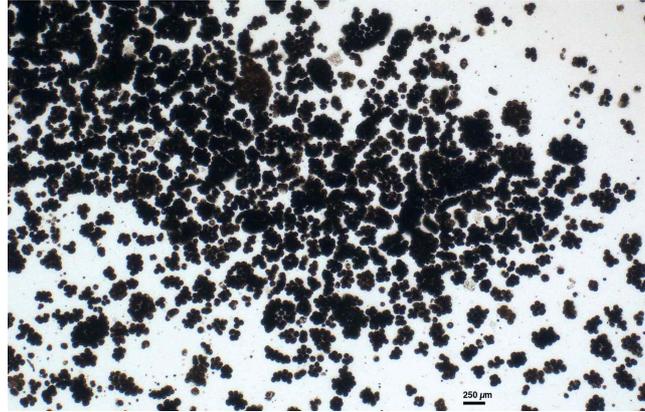
Mg<sup>2+</sup>) platziert. Mit einer Pinzette wird die Retina gegriffen und vorsichtig bis zum Sichtbarwerden des Nervus opticus umgeklappt. Die Retina sollte vollständig vom RPE gelöst sein und es sollten sich keine RPE-Sheets an der Retina befinden. Der Nervus opticus wird durchtrennt und die Retina entfernt.

8. Der Augenbecher wird in eine 24-Lochschale mit 355  $\mu$ l Dissoziationspuffer (875  $\mu$ l PBS-EDTA + 115  $\mu$ l L-Cys-Solution + 10  $\mu$ l BSA) umgesetzt.
9. Das Innere des Augenbechers wird 6 mal mit einem 20  $\mu$ l Flüssigkeitsimpuls beschossen, dabei wird das RPE aus dem Augenbecher herausgelöst. Hierzu wird eine 100  $\mu$ l Pipette und 120  $\mu$ l zusätzlicher Dissoziationspuffer verwendet. Der Augenbecher wird verworfen.
10. Zu der Zellsuspension werden 25  $\mu$ l aktiviertes Papain (Papain, Sigma P3125, 18 U/mg, 26 mg/ml), gelöst in 500  $\mu$ l Dissoziationspuffer und einer Konzentration von 2 U, hinzupipettiert. Dadurch entsteht ein Endvolumen von 500  $\mu$ l (355  $\mu$ l + 6 x 20  $\mu$ l + 25  $\mu$ l) und eine Endkonzentration von 0,1 U. Die Suspension wird für 15 Minuten bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Zellkulturinkubator inkubiert
11. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die Lösung wird in ein 14 ml Röhrchen überführt und bei 100 G für 3 Minuten runter zentrifugiert (Acceleration langsam 4, and Deceleration langsam 4)
12. Der Überstand wird abgesaugt und verworfen. Zu dem Zellpellet werden 5  $\mu$ l (=5  $\mu$ g) Fibronectin hinzugefügt.
13. Das Zellpellet wird ad 100  $\mu$ l Zellkulturemedium resuspendiert und tropfenförmig in ein 24-Loch oder auf einen kleinen Glas Cover Slip ausgesät. Zur besseren Zelladhäsion wird die jeweilige Oberfläche vorher mit 5  $\mu$ l Fibronectin bedeckt und luftgetrocknet. Die angelegten Kulturen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.
14. 24 Stunden nach Aussaat werden zu den Kulturen vorsichtig 500  $\mu$ l Zellkulturmedium hinzupipettiert.

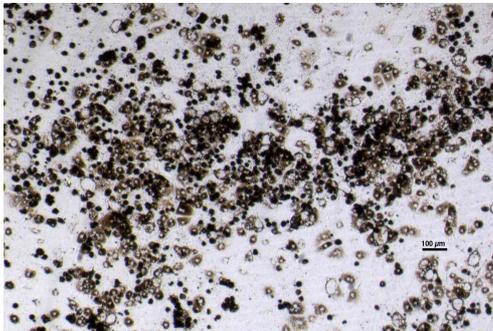
15. 72 Stunden nach Aussaat wird der Überstand der Kulturen abgenommen und neu ausgesät.
16. Nach Abnahme des Überstandes wird die Kulturen mit PBS gespült und mit Medium aufgefüllt, dabei werden nicht adhärente Zellen entfernt.

Das Medium wurde dreimal pro Woche gewechselt.

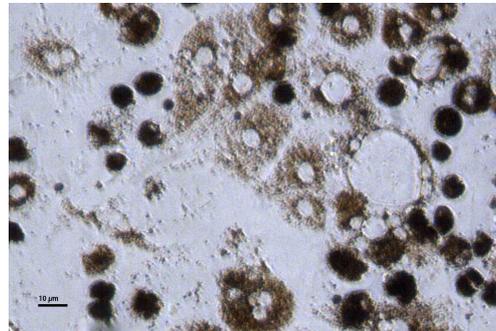
Ab dem 12. Tag nach der Aussaat kam es zur Ausbildung einer subkonfluenten Zellschicht. Im weiteren Verlauf bildete sich eine konfluenten Einzelzellschicht aus, an der weitere Funktionsuntersuchungen durchgeführt werden können. Abbildungen 4.20 und 4.21 zeigen den Proliferationsverlauf einer RPE-Zellkultur über 28 Tage. Der durchschnittliche Isolationsscore bei der Anwendung des unter 4.2 aufgeführten Protokolls betrug 27,3 Punkte (n=196) bei einem Maximalwert von 35 Punkten.



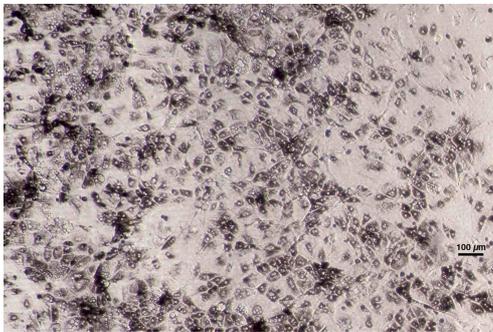
(a) Aussaat 20 x



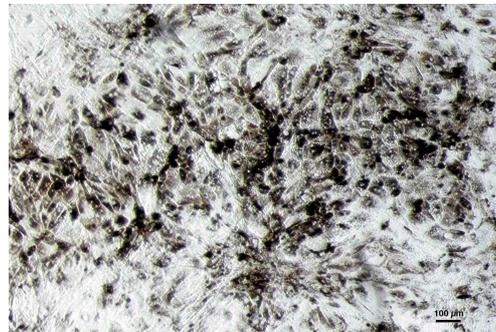
(b) Nach 3 Tagen 40 x



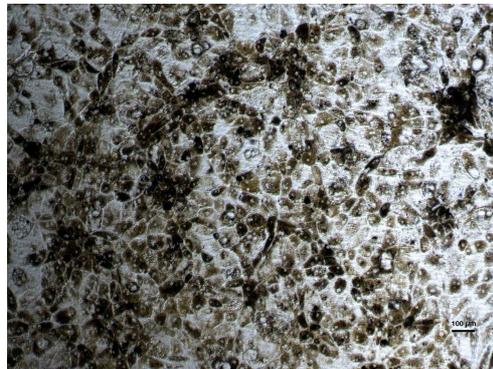
(c) Nach 3 Tagen 200 x



(d) Nach 5 Tagen 40 x

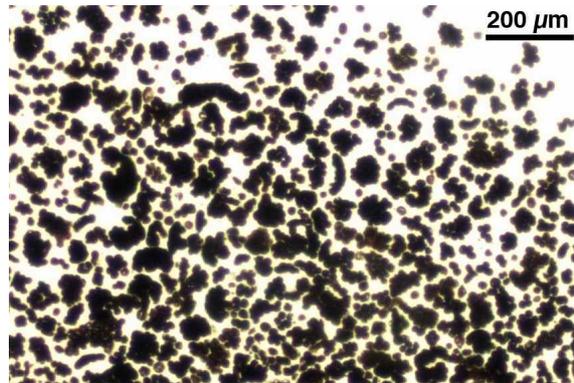


(e) Nach 12 Tagen 40 x

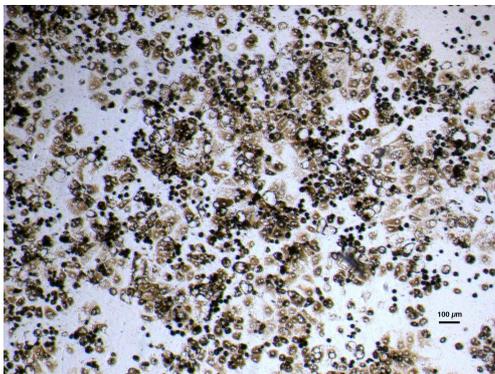


(f) Nach 28 Tage 50 x

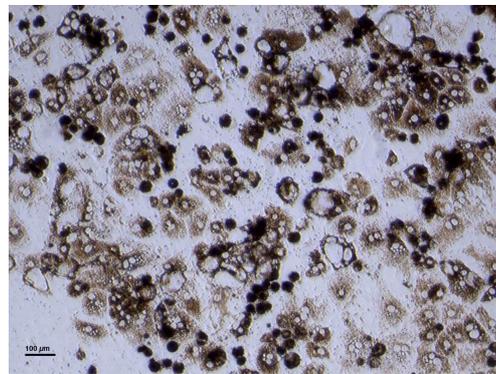
Abbildung 4.20: RPE-Zellkulturen, die nach dem unter Punkt 4.2 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von RPE-Zellkulturen isoliert und kultiviert worden sind.



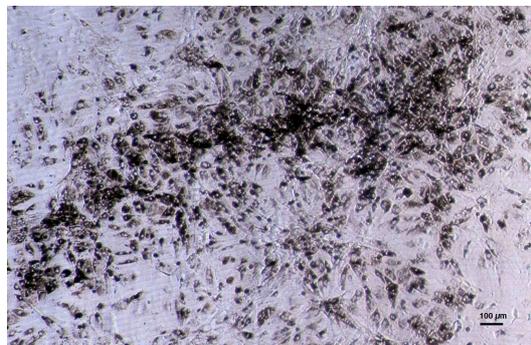
(a) Aussaat 20 x



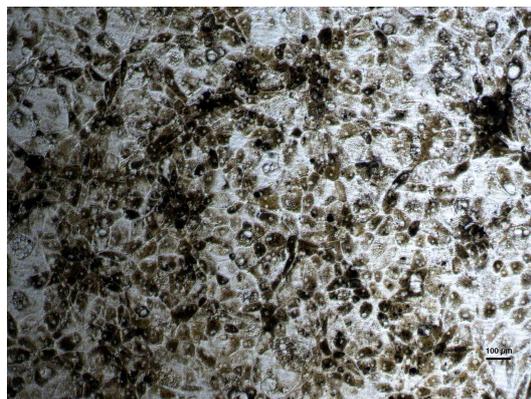
(b) Nach 3 Tagen 40 x



(c) Nach 3 Tagen 100 x



(d) Nach 5 Tagen 40 x



(e) Nach 4 Wochen 50 x

Abbildung 4.21: RPE-Zellkulturen, die nach dem unter Punkt 4.2 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von RPE-Zellkulturen isoliert und kultiviert worden sind.

### 4.2.1 Zusätze

In der Zellkultur wurden die Zellen von mehreren Präparationen gepoolt und mit dem Medium F99 Medium mit einer Serumkonzentrationen von 10 % ausgesät und das Proliferationsverhalten der Kulturen mit einer Gruppe aus Kontrollkulturen verglichen. Den Kulturen wurde dafür bei jedem Mediumwechsel drei mal pro Woche bFGF in einer Konzentration von 20 ng/ml und EGF in einer Konzentration von 10 ng/ml hinzugefügt. Die Kulturen der Kontrollgruppe bekamen keine Zusätze. Das Proliferationsverhalten der Kulturen wurde dreimal pro Woche mikroskopisch begutachtet.

Tabelle 4.8: Proliferationsverlauf mit und ohne Wachstumszusätze

10 Kulturen mit bFGF	10 Kulturen ohne bFGF
Subkonfluenz nach 12 Tagen	Subkonfluenz nach 13 Tagen
Konfluenz nach 29 Tagen	Konfluenz nach 28 Tagen

#### 4.2.1.1 Zusammenfassung

Nach einem Beobachtungszeitraum von vier Wochen konnte keine Verbesserung der Zellproliferation der mit Zusätzen behandelten Kulturen im Vergleich mit der Kontrollgruppe dokumentiert werden.

### 4.2.2 TER-Messung

Die Kulturen wurden nach den unter 3.5.2 beschriebenen Verfahren hergestellt und der TER wie unter 3.5.2 ca. einmal pro Woche gemessen. Es wurden 50 Kulturen angelegt.

Nach der Aussaat der frisch isolierten RPE-Zellen auf die Filtermembranen konnte nach ca. 12 h eine Anheftung der Zellen beobachtet werden. Ca. 24 h nach Aussaat begannen die Zellen zu proliferieren. Der transepitheliale Widerstand wurde erstmalig nach ca. 24 h gemessen. Alle 50 der angelegten Kulturen wurden über einen Zeitraum von 70 Tagen beobachtet, 40 über einen Zeitraum von 80 Tagen und

30 über einen Zeitraum von 90 Tagen. Nach ungefähr 14-21 Tagen erreichten die Kulturen Subkonfluenz, nach 28 Tagen Konfluenz. Analog dazu stieg in dieser Zeit auch der gemessene transepitheliale Widerstand stetig an. Die Proliferationsgeschwindigkeit variierte zwischen den angelegten Kulturen und ebenso der Anstieg des transepithelialen Widerstands. Eine detaillierte graphische und tabellarische Aufstellung aller TER-Rohdaten befindet sich im Appendix unter 6.2, Tabelle 6.14 und Abbildung 6.1 - 6.5.

Zusammenfassend konnte ein Anstieg des transepithelialen Widerstandes auf Werte im Bereich von  $120-150 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ca. 90 Tage nach Aussaat beobachtet werden. In den ersten 40-50 Tagen war der Anstieg des transepithelialen Widerstandes am größten. Danach verlangsamte sich der Anstieg und zeigte einen plateauähnlichen Verlauf mit nur noch geringem Anstieg. Die Abbildungen 4.22 und 4.23 stellen den Anstieg der TER-Werte graphisch dar. Die Mittelwerte ergaben sich aus den Einzelwerten aller Kulturen. Diese wurden in zeitlicher Abfolge graphisch aufgetragen. Bei dem Vergleich von TER-Werten zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ), dass die gefundenen Unterschiede bei Gültigkeit der Nullhypothese aufgetreten wären, mit One-Way ANOVA und dem Tukey multiple Vergleichstest berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 dargestellt.

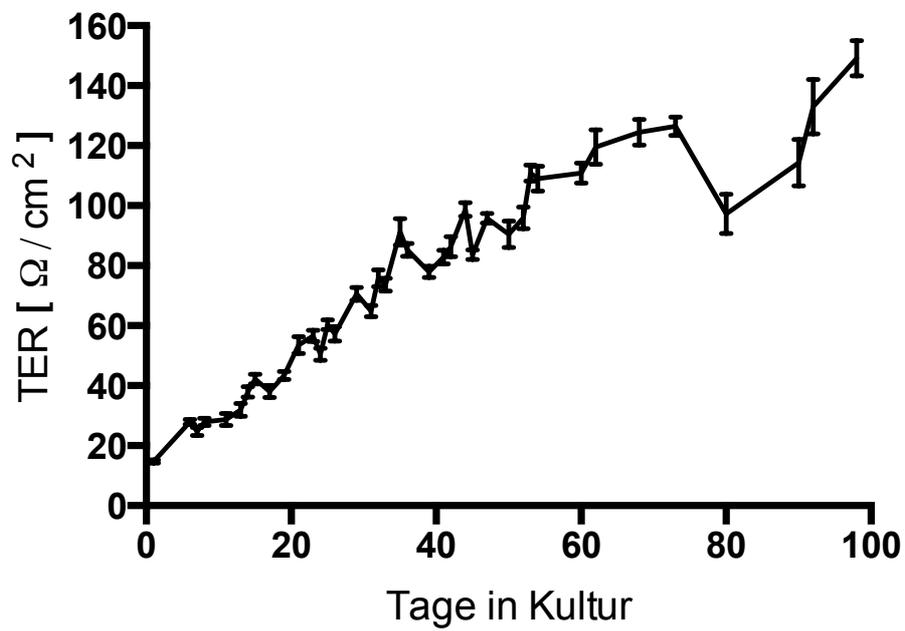


Abbildung 4.22: Mittelwerte der gemessenen TER-Werte von 50 Kulturen

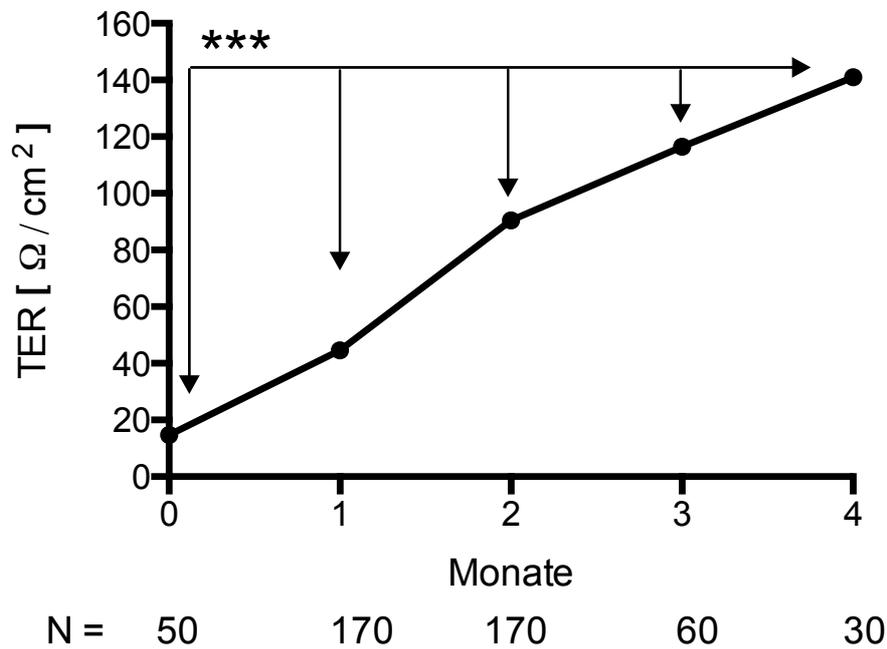
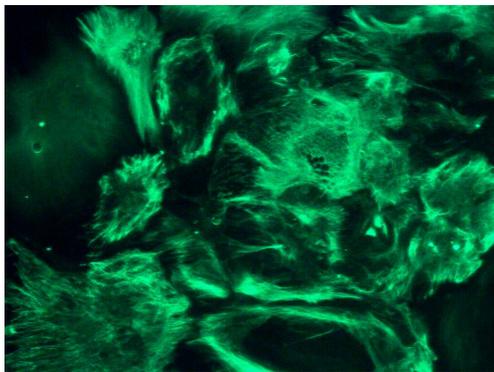


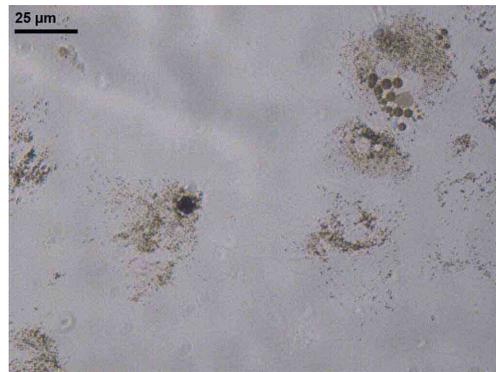
Abbildung 4.23: Mittelwerte der gemessenen TER-Werte pro Monat (siehe Abbildung 4.22) von 50 Kulturen mit statistischer Analyse, ANOVA, N = Messpunkte, \*\*\* =  $\leq 0,05$

### 4.2.3 Immunhistochemie an RPE in vitro

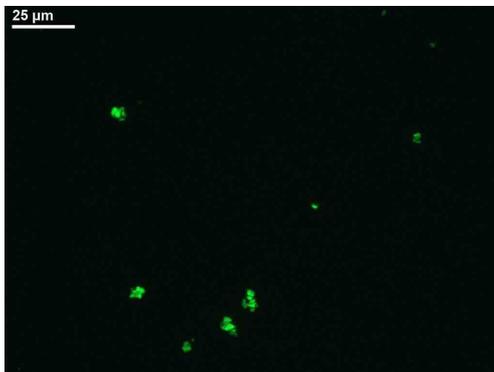
Verschiedene Cytokeratine werden von RPE-Zellen exprimiert. Um die nach dem unter Punkt 4.2 beschriebenen Protokoll hergestellten RPE-Zellkulturen auf diese Eigenschaft hin zu kontrollieren, wurde ein Antikörper gegen mehrere Cytokeratine als epithelspezifischer Marker eingesetzt (Stanzel et al., 2005). Die Immunocytochemischen Färbungen wurden wie unter 3.5.1.1 beschrieben durchgeführt. Die durchgeführten Färbungen konnten den Nachweis von Pancytokeratin in den untersuchten RPE-Zellkulturen erbringen, siehe hierzu Abbildung 4.24 a und b. Die Leerkontrolle ohne Primärantikörper zeigte lediglich eine schwache Fluoreszenz, siehe Abbildung 4.24 c und d.



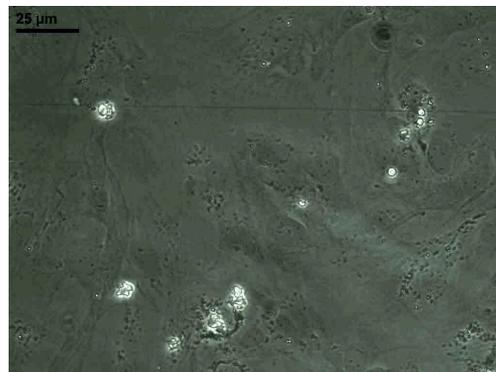
(a)



(b)



(c) RPE-Zellkultur ohne Pri ak Flu



(d) RPE-Zellkultur ohne Pri ak

Abbildung 4.24: a-d: RPE-Zellkultur im Alter von 10 Tagen, 100 x. a: Kultur nach Färbung mit dem Primärantikörper Pancytokeratin. b: Leerkontrolle zu a. c: Kultur ohne Färbung mit dem Primärantikörper Pancytokeratin. d: Leerkontrolle zu c.

# Kapitel 5

## Diskussion

Die in dieser Arbeit entwickelten Protokolle ermöglichen mit reproduzierbarem Erfolg die Isolation von nativen RPE-Einzelzellen mit polarisierter Morphologie und funktionsfähigen RPE-Zellverbänden. Die frisch isolierten RPE-Einzelzellen können zur Herstellung von proliferationsfähigen RPE-Zellkulturen genutzt werden, oder wie auch die RPE-Zellverbände unverzüglich für Funktionsuntersuchungen verwendet werden. Um diese Isolationsprodukte zu erzielen, wurden Techniken der gängigen Literatur ausprobiert, modifiziert und durch weitere Maßnahmen ergänzt.

### 5.1 Isolationsprotokolle

#### 5.1.1 Vorbehandlung

Viele der in der Literatur beschriebenen Ansätze, siehe Tabelle 5.1, inkubieren den Bulbus mit Enzymen oder Medium vor der Dissektion. Dieser Ansatz hat den Nachteil, dass die Sklera eine intakte Barriere gegen die eingesetzten Enzyme oder ähnliche Metabolite darstellt. Der Beginn der Inkubation nach Entfernung des anterioren Segmentes ermöglicht dagegen eine direkte Applikation der aktiven Metabolite zur Vorbereitung der Präparation der Retina. Es wurde die Methode des  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzuges gewählt (Hayashi et al., 1978) . Hierdurch ziehen sich die dem

RPE aufliegenden Mikrovilli der Retina zurück und lösen die anatomische Verbindung der Retina mit dem RPE. Die Verwendung von 1 mM PBS-EDTA zeigte die besten Ergebnisse. Bei höher konzentriertem PBS-EDTA zeigten die Zellen mikroskopisch erkennbare Blasenbildung und der Kulturerfolg blieb aus. Die Kombination mit der Inkubation in Medium vor der Inkubation in PBS-EDTA hatte sich bereits in anderen Isolationsprotokollen bewährt (Geisen et al., 2006). Die Verwendung der Inkubationslösungen F99 und PBS-EDTA 1 mM ermöglichte die Entfernung der Retina mit minimalem Schaden des RPE durch Anheften an die Retina. Darüber hinaus kommt im Rahmen der entwickelten Protokolle dem Einsatz von PBS-EDTA eine besondere Rolle zu, da eine Veränderung der Inkubationszeit im weiteren Verlauf die Isolation von funktionsfähigen RPE-Zellverbänden ermöglichte. Der Einsatz von Enzymlösungen in unterschiedlicher Kombination und Konzentration zur Vorbehandlung des anterioren Segmentes konnte keine vergleichbaren Ergebnisse bringen und wurde daher nicht in die Vorbehandlung des anterioren Segmentes integriert.

### 5.1.2 Enzymatische Behandlung

Um die Verbindungen der RPE-Zellen zu lockern, wurde der Bulbus nach Entfernung der Retina in einer Papainlösung inkubiert. Die Verwendung von Papain in niedriger Konzentration erzielte die besten Isolations- und Kulturergebnisse im Vergleich mit allen weiteren getesteten Enzymen, siehe 4.1.3. Kombinationen von unterschiedlichen Enzymlösungen oder höher konzentrierten Einzelenzymlösungen erzeugten bei den isolierten Zellen mikroskopisch erkennbare Schäden. Zellen mit polarisierter Morphologie ließen sich nicht isolieren und die isolierten Zellen eigneten sich nicht zur Herstellung von Zellkulturen. Die in Tabelle 5.1 aufgeführten Isolationsprotokolle benötigen einen erheblichen mechanischen Aufwand (Gibbs and Williams, 2003), um die RPE-Zellen heraus zu präparieren. Dies erhöht das Risiko für eine Kontamination des Isolationsproduktes durch andere Zellen wie z.B. Fibroblasten oder Melanozyten und sorgt gleichzeitig für Zellschäden bei den zu isolierenden Zellen.

### 5.1.3 Mechanische Manipulation

Die mechanische Manipulation ist notwendig, um die RPE-Zellen aus ihrer Verbindung mit der Bruchmembran, aber auch aus ihrer Verbindung miteinander zu lösen. Das Abschaben des RPE-Gewebes erwies sich als ungeeignet. Die dabei isolierten Gewebestücke waren zu groß und die Kontamination durch andere Zellen wie Melanozyten und Fibroblasten konnte nicht verhindert werden. Eine weitere enzymatische Prozessierung war ebenfalls nicht möglich, da die Größenunterschiede der isolierten Gewebe zu erheblich waren. Hinzu kam, dass die Weiterverarbeitung nicht ergebnisorientiert beeinflussbar war. Es war nicht möglich, den Prozess in einer Weise zu steuern, um mehrheitlich Einzellzellen oder aber Zellverbände unterschiedlicher Größe zu erhalten. Die Titration der Bulbi mit einer Cell-Saver-Pipettenspitze konnte die Erwartungen an eine sanfte Gewebseparation bei mikroskopischer Betrachtung nicht erfüllen. Bei zu geringem Titrationsaufwand war die Zellausbeute nicht suffizient, bei zu hohem gab es viele traumatisch bedingte Zellschäden. Des Weiteren waren die mit hohem Titrationsaufwand gewonnenen Zelllösungen durchsetzt von großen Gewebsakkumulaten, deren enzymatische Weiterbehandlung aufgrund der geringen Angriffsfläche nicht möglich war und auch die Kontamination der Zellkulturen mit anderen Zellarten stellte ein Problem dar.

Um diese Probleme zu lösen, war unser Ziel in der Entwicklung der Isolationsprotokolle die Minimierung der mechanischen Manipulation. Daher verzichteten wir darauf, das RPE von der Bruchmembran abzuschaben oder den Bulbus zu titrieren und spülten stattdessen den Bulbus mit einigen Flüssigkeitsimpulsen an. Hierdurch können gerichtete Flüssigkeitsimpulse punktuell auf das vorbehandelte RPE-Gewebe im Bulbus appliziert werden, ohne dass direkter Kontakt zur Pipettenspitze oder einer anderen Oberfläche nötig ist. Der Bulbus kann in der Flüssigkeit frei flottieren, wodurch Abscherungen des Bulbus an der Gefäßoberfläche verhindert werden können. Auf diese Weise wird der traumatische Effekt auf das RPE-Gewebe bei zugleich ausreichender Kraftapplikation minimalisiert. Die dabei aufgewendete Energie ist ausreichend, um die RPE-Zellen aus ihrer Verbindung mit der Bruchmembran zu lösen, jedoch zu gering, um die RPE-Zellen zu beschädigen. Die Technik fordert eine hohes Maß an Übung von Seiten des Anwenders.

Die Etablierung der Technik führte aber zu einer hohen Ausbeute von vitalen RPE-Einzelzellen und RPE-Zellverbänden, die mit den bisher beschriebenen Techniken nicht zu erlangen ist.

#### 5.1.4 Zusammenfassung Isolationsprotokolle

Zur Produktion von murinen RPE-Einzelzellen mit polarisierter Morphologie, die entweder zur sofortigen Verwendung oder zur Herstellung von RPE-Zellkulturen verwendet werden können, ist ein schonendes Isolationsprotokoll erforderlich. Die Inkubationsschritte mit F99 Kulturmedium und PBS-EDTA erfolgen hauptsächlich zur atraumatischen Ablösung der Retina und sollten nach Entfernung des anterioren Segmentes erfolgen. Weitere Inkubationen vor Präparation des Bulbus verlängern lediglich die Kaltischämiezeit ohne positive Effekte auf die Isolationsergebnisse. Speziell für die Herstellung von RPE-Zellkulturen ist die Minimierung der traumatischen Effekte, sowohl chemisch als auch mechanisch. Daher ist die Inkubationsdauer in einer Enzymlösung so kurz wie möglich gewählt bei gleichzeitig niedriger Enzymkonzentration. Die direkte Applikation von Flüssigkeitsimpulsen auf das RPE ist einer der Schlüsselmomente des Protokolls. Hierbei sollte darauf geachtet werden, dass die Pipettenspitze direkt auf das Innere des Bulbus gerichtet ist, da die Bulbi nach der enzymatischen Behandlung gelegentlich zusammenklappen und so ein effektives Anspülen verhindert wird. Bei der Aussaat der Zellen für eine Kultur sollte eine ausreichende Zelldichte gewährleistet sein um Dedifferenzierungen der Zellen bei zu hoher Proliferation im weiteren Verlauf zu verhindern. Eine Aussaatdichte von der Ausbeute eines Bulbus auf 1 cm<sup>2</sup> erwies sich als suffizient. Zur Isolation von RPE-Zellverbänden werden die Inkubationszeiten in F99 Medium und PBS-EDTA geringfügig verändert. Nach Entfernung der Retina wird auf die enzymatische Behandlung verzichtet und direkt das Anspülen mit Flüssigkeitsimpulsen vorgenommen.

Tabelle 5.1: Vergleich von publizierten RPE-Isolationstechniken

Referenz	Spezies	Ergebnis	Isolationstechnik
Geisen et al. (2006)	Maus	Kultur	1. Inkubation in Medium (DMEM), 2. 45 Minuten Inkubation in Dispase (2 %), 3. Dissektion des Bulbus, 4. 20 Minuten Inkubation in Medium (DMEM), 5. Präparierung des RPE, 5. 6 Minuten Inkubation in Trypsin (0,05 %) 7. Titration des RPE-Gewebes, 8. Aussaat
Gibbs and Williams (2003)	Maus	Kultur	1. 45 Minuten Inkubation in Dispase (2 %), 2. Dissektion des Bulbus, 3. 20 min Inkubation in Medium, 4. Abpräparierung des RPE, 5. Titration des RPE-Gewebes, 6. Aussaat
Mayerson and Hall (1986)	Ratte	Kultur	1. 45-90 Minuten Inkubation in Collagenase (105 U/ml) und Hyaluronidase (50 U/ml), 2. 57-72 Minuten Inkubation in Trypsin (0,1%), 3. Dissektion des Bulbus, 4. Abpräparieren des RPE, 5. 1,5-2,5 Minuten Inkubation in Trypsin (0,1%), 6. Titration des RPE-Gewebes, 7. Aussaat
Edwards (1977)	Ratte	Kultur	1. 6-24 h Inkubation in BSS, 2. Dissektion des Bulbus, 3. 45 Minuten Inkubation in Trypsin (1 mg/ml, 1:250) und Collagenase (70 U/ml), 4. Dissektion des Bulbus, 5. Abpräparation des RPE, 6. 1-4 Minuten Inkubation in Trypsin (1 mg/ml), 7. Titration des RPE-Gewebes, 8. Aussaat
Maminishkis et al. (2006)	Human	Kulture	1. Dissektion des Bulbus, 2. 30 Minuten Inkubation in Dispase (2U/ml), 3. Abpräparation des RPE, 4. Titration des RPE-Gewebes, 5. Aussaat

*Fortsetzung nächste Seite...*

... Fortsetzung

Referenz	Spezies	Ergebnis	Isolationstechnik
Adamis et al. (1993)	Human	Kultur	1. Dissektion des Bulbus, 2. 15 Minuten Inkubation mit Trypsin (0,25 %), 3. Titration des RPE-Gewebes, 4. Aussaat
Ablonczy and Crosson (2007)	Schwein	Kultur	1. Dissektion des Bulbus, 2. 60 Minuten Inkubation mit Trypsin (0,05%), 3. Aussaat
Hughes and Steinberg (1990)	Frosch	Kultur	1. Dissektion des Bulbus, 2. Präparation des RPE, 3. Inkubation mit Papain (0,2 mg/ml), 4. Titration des RPE-Gewebes, 5. 40-60 Minuten Inkubation in Pufferlösung, 6. Titration des RPE-Gewebes
Stanzel et al. (2005)	Kaninchen	Kultur	1. 60 Minuten Inkubation in BBS, 2. Injektion von PBS in die Retina und Ablösung der Retina, 3. 60 Minuten Inkubation mit Collagenase, 4. Abpräparation des RPE, 5. Aussaat
Hayashi et al. (1978)	Huhn	Kultur	1. Dissektion des Bulbus, 2. Entfernung der Retina, 3. 30-60 Minuten Inkubation in PBS-EDTA (0,54 mM), 4. Abpräparation des RPE, 5. 2 h Inkubation mit Trypsin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), DNase (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Collagenase (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 6. Titration des Gewebes, 7. Aussaat
Hartnett et al. (2003)	Rind	Kultur	1. Dissektion des Bulbus, 2. 60 Minuten Inkubation mit Trypsin (0-125%), 3. Titration des RPE-Gewebes, 4. Aussaat

Tabelle 5.2: Vergleich von publizierten RPE TER-Daten, die in Kultur erhoben wurden

Referenz	Spezies	Dauer bis zur Konfluenz	Zelltyp	TER in $\Omega \times cm^2$
Peng et al. (2003)	Huhn	nn	E7	20-80
Peng et al. (2003)	Huhn	nn	E14	100-200
Gallemore et al. (1993)	Huhn	nn	RPE in situ	138
Dunn et al. (1996)	Human	4 Wochen	ARPE19	50-100
Geisen et al. (2006)	Maus	2 Wochen	RPE	33
Geisen et al. (2006)	Human	1-3 Wochen	ARPE19	30
Geisen et al. (2006)	Human	4 Wochen	hfRPE	$\geq 500$
Ablonczy and Crosson (2007)	Schwein	5-11 Wochen	RPE	$76 \pm 9$
Ablonczy and Crosson (2007)	Human	2-5 Wochen	ARPE19	$45 \pm 4$
Hartnett et al. (2003)	Rind	2 Wochen	RPE	30-70
Liu et al. (2013)	Human	6-8 Wochen	hfRPE	435-1227
Maminishkis et al. (2006)	Human	3-4 Wochen	hfRPE	$501 \pm 138$
Shirasawa et al. (2013)	Schwein	4 Wochen	RPE	$220 \pm 23, 6$

## 5.2 Anwendungen der Ergebnisse und weitere Fragestellungen

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals RPE-Zellen im Zellverband zur weiteren reproduzierbaren Untersuchung isoliert werden. In unserem Labor sind an diesen Zellverbänden Messungen von Calcium Signalen vorgenommen worden (Neusert et al., 2010) und (Marmorstein et al., 2006). Die Untersuchungen dieser RPE-Zellverbände bietet jedoch noch weiteres Potenzial. So kann die Überlebensdauer der isolierten RPE-Zellverbände untersucht werden, ebenso die Kommunikationsfähigkeit zwischen den Zellen und das Vorhandensein einer funktionierenden Zellbarriere. Die isolierten RPE-Einzelnzellen können nach der Isolation direkt für Funktionsuntersuchungen wie Patch-Clamp-Messungen an diversen Ionenkanälen verwendet werden. Dies ist durch Mitglieder unseres Labors bereits gezeigt worden. Weiter können die RPE-Einzelnzellen ausgesät und in Kultur zur Proliferation gebracht werden. Nach ca. 28 Tagen erreichten die Kulturen Konfluenz, dies ist vergleichbar mit den Daten aus anderen Studien (Dunn et al., 1996) und (Geisen et al., 2006), jedoch länger als bei der Verwendung von fetalem RPE (Gibbs and Williams, 2003). Dort erreichen die Kulturen bereits nach 7-10 Tagen Konfluenz. Die Proliferationsfähigkeit der in dieser Arbeit isolierten Kulturen war begrenzt, sodass zum Anlegen größerer Kulturen eine höhere Anzahl von Bulbi notwendig waren. An den Kulturen lassen sich über einen Zeitraum von 80 Tagen steigende TER-Werte nachweisen, die höher ausfallen als in vorangegangenen Untersuchungen (Geisen et al., 2006) und über längere Zeit persistieren, siehe 5.2. Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Zahl der in dieser Arbeit untersuchten Kulturen mit 50 als niedrig einzustufen ist und weiterer Überprüfung bedarf. Davon unabhängig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in dem etablierten RPE-Zellkulturmodell eine funktionsfähige RPE-Einzelschicht aufgebaut werden kann, deren Durchlässigkeit sich über TER-Messungen evaluieren lässt. Das RPE bildet in situ einen Teil der Blut-Retina-Schranke. Daher könnte dieses RPE-Zellkulturmodell als Modell zur Erforschung der Blut-Retina-Schranke etabliert werden und im weiteren Verlauf als Modell für die Blut-Hirn-Schranke genutzt werden. Eine weitere Untersuchungsmöglichkeit an den erstellten Kulturen stel-

len Sekretionsanalysen und Phagozytosemessungen dar, allerdings ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden, ob dies zu verwertbaren Ergebnissen führt oder nicht.

## 5.3 Ausblick

Zur Erforschung des RPE stehen Zelllinien aus immortalisierten RPE-Zellen von verschiedenen Spezies zur Verfügung. Diese Zelllinien sind einfach verfügbar und bieten reproduzierbare Eigenschaften in der Zellkultur, die jedoch nur begrenzt auf natives Gewebe zu übertragen sind. Hinzu kommt, dass für transgene Mausmodelle meist keine entsprechenden Zelllinien zur Verfügung stehen. Transgene Mausmodelle, in denen genetische Variationen, welche zu Pathologien des RPE und der Retina führen, nachvollzogen sind (Chen et al., 2001) und (Besch et al., 2003), bieten zahlreiche weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten wie Sekretionsanalysen oder Phagozytosemessungen. Hierfür sind effektive Protokolle notwendig, um die RPE-Zellen isolieren zu können und in Kultur zur Proliferation zu bringen. Die in dieser Arbeit entwickelten Protokolle können eben dies leisten. Die Kombination der Existenz der transgenen Mausmodelle in Verbindung mit den neuen Isolationsmöglichkeiten ermöglicht weitere Ansätze zur Erforschung der bekannten Pathologien. Deswegen leisten die neuen Isolationsprotokolle einen wichtigen Beitrag zur translationalen Forschung am RPE. Humane embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit, in jede Körperzellart zu differenzieren. Dies schließt RPE-Zellen mit ein und bedeutet sowohl therapeutische als auch Forschungsmöglichkeiten, die womöglich einen Teil der murinen Forschungsansätze ersetzen können (Lund et al., 2006). Jedoch bietet die Forschung an transgenen murinen Modellen aktuell zahlreiche Möglichkeiten wie die Erforschung spezifischer genetischer Mutationen *in vitro* und *in situ*, die zur Zeit nicht durch die embryonalen Stammzellen ersetzt werden können. Für diese Forschung sind die in dieser Arbeit entwickelten Isolationsprotokolle von großer Bedeutung. Gentherapeutische Ansätze, in denen RPE-Zellen genetisch modifiziert und im Anschluss transplantiert werden Acland et al. (2001), bedürfen ebenfalls eines schonenden Protokolls, um zuvor transplantierte Zellen wieder isolieren zu können. So können mögliche Veränderungen nach

der Transplantation als Reaktion auf das Wirtsumfeld und daraus resultierende veränderte Anforderungen an die Zellen nachvollzogen werden.

# Kapitel 6

## Appendix

### 6.1 Tabellen

Tabelle 6.1: Ansätze zur Vorbehandlung vor Entfernung des anterioren Augensegmentes

Substanz	Dauer	n
Pucksche Lösung	3h	176
Pucksche Lösung	12-18h	4

Tabelle 6.2: Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit einer Flüssigkeit

Substanz	Konzentration	Dauer	n
PBS EDTA	1 mM	30-60 min	6
PBS EDTA	1 mM	45 min	10
PBS EDTA	1 mM	60 min	8

Tabelle 6.3: Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit einer Kombination aus zwei Flüssigkeiten

Substanz 1	Dauer	Substanz 2	Konzentration	Dauer	n
F99	10 min	PBS-EDTA	1 mM	30 min	16
F99	10 min	PBS-EDTA	1 mM	35 min	12
F99	10 min	PBS-EDTA	1 mM	40 min	4
F99	10 min	PBS EDTA	1 mM	45 min	4
F99	10 min	PBS EDTA	1 mM	60 min	4
F99	10 min	PBS EDTA	1 mM	70 min	2
F99	10 min	PBS EDTA	2 mM	60 min	4
F99	12 min	PBS EDTA	1 mM	37 min	4
F99	12 min	PBS EDTA	1 mM	40 min	8
F99	15 min	PBS EDTA	1 mM	50 min	50
F99	20 min	PBS EDTA	1 mM	27 min	2
F99	20 min	PBS EDTA	1 mM	30 min	16
F99	25 min	PBS EDTA	1 mM	30 min	2
F99	30 min	PBS EDTA	1 mM	60 min	2
F99 Ca-frei	15 min	PBS EDTA	1 mM	30 min	6
F99 Ca-frei	20 min	PBS EDTA	1 mM	30 min	26
F99 Ca-frei	20 min	PBS EDTA	1 mM	45 min	22
F99 Ca-frei	30 min	PBS EDTA	1 mM	30 min	4

Tabelle 6.4: Ansätze zur Vorbehandlung nach Entfernung des anterioren Augensegmentes mit der Kombination aus drei Flüssigkeiten

Substanz	Dauer	Substanz 2	Dauer	Substanz 3	Konzentration	Dauer	n
PBS	15 min	F99	15 min	PBS EDTA	1 mM	60 min	4

Tabelle 6.5: Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor Entfernung der Retina mit dem Enzym Collagenase

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Collagenase Ia 9891	0.1 mg/ml	50 min	500 $\mu$ l	2
Collagenase Ia 9891	0.1 mg/ml	105 min	500 $\mu$ l	2
Collagenase 1a 9891	1 mg/ml	75 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a 9891	1 mg/ml	3,5 h	250 $\mu$ l	2
Collagenase 4 5178	0.1 mg/ml	105 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 4 5178	1 mg/ml	90 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 4 5178	1 mg/ml	180 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 2674	0.1 mg/ml	60 min	250 $\mu$ l	1
Collagenase 1a/4 2674	0.1 mg/ml	90 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 2674	0.1 mg/ml	3.5 h	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 2674	0.1 mg/ml	4 h	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 9891	0.1 mg/ml	4 h	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 2674	0.5 mg/ml	90 min	500 $\mu$ l	1
Collagenase 1a/4 9891	0.5 mg/ml	90 min	500 $\mu$ l	1
Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	15 min	1 ml	2
Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	20 min	1 ml	8
Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	60 min	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	2 h	250 $\mu$ l	2
Collagenase 1a/4 9891	1 mg/ml	2 h	250 $\mu$ l	1
Collagenase Ia/4 2674	1 mg/ml	25 min	1 ml	2
Collagenase Ia/4 2674	1 mg/ml	25 min	500 $\mu$ l	2
Collagenase Ia/4 2674	1 mg/ml	40 min	250 $\mu$ l	2

Tabelle 6.6: Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor Entfernung der Retina mit dem Enzym Dispase

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Dispase	10 U	60 min	250 $\mu$ l	2

*Fortsetzung nächste Seite...*

... Fortsetzung

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Dispase	10 U	45 min	250 $\mu$ l	2
Dispase	10 U	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	10 U	15 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	5 U	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	4 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	5 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	5 U	7,5 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	15 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	20 min	250 $\mu$ l	2
Dispase	50 U	25 min	250 $\mu$ l	1
Dispase	50 U	40 min	250 $\mu$ l	2

Tabelle 6.7: Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor Entfernung der Retina mit dem Enzym Papain

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Papain	1 U	10 min	500 $\mu$ l	1
Papain + BSA	1 U + 1 mg/ml	10 min	500 $\mu$ l	1
Papain HE	2.5 U	10 min	500 $\mu$ l	1
Papain HE	5 U	10 min	1ml	1

Tabelle 6.8: Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor Entfernung der Retina mit dem Enzym Trypsin

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Trypsin	0.05 %	40 min	250 $\mu$ l	1
Trypsin	0.05 %	45 min	250 $\mu$ l	2
Trypsin	0.05 %	50 min	250 $\mu$ l	1
Trypsin	0.05 %	60 min	250 $\mu$ l	2

Fortsetzung nächste Seite...

... Fortsetzung

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Trypsin WE	0.1 %	25 min	500 $\mu$ l	2
Trypsin	0.1 %	30 min	250 $\mu$ l	1
Trypsin	0.1 %	60 min	250 $\mu$ l	1
Trypsin	0.2 %	60 min	1 ml	15
Trypsin	0.2 %	105 min	1 ml	4

Tabelle 6.9: Ansätze zur enzymatischen Behandlung vor Entfernung der Retina mit einer Enzymkombination

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Dispase + Collagenase 1a	1 U + 0.5 mg/ml	50 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 1a	40 U + 1 mg/ml	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 1a	30 U + 2 mg/ml	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 4	0.95 U + 0.5 mg/ml	30 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 4 (5138)	1 U + 1 mg/ml	30 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 4	40 U + 1 mg/ml	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 4	45 U + 0.5 mg/ml	10 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase 1a/4 (9891)	5 U + 1 mg/ml	33 min	250 $\mu$ l	1

Fortsetzung nächste Seite...

... Fortsetzung

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Dispase + Collagenase 1a/4 (9891)	10 U + 1 mg/ml	33 min	250 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase Ia/4 + BSA	10 U + 1 mg/ml + 1 mg/ml	30 min	500 $\mu$ l	1
Dispase + Collagenase Ia/4 (2674)	10 U + 1 mg/ml	25 min	500 $\mu$ l	1
Collagenase Ia/4 + Trypsin	1 mg/ml + 0.1 %	30 min	500 $\mu$ l	1
Dispase + Trypsin + BSA	10 U + 0.1 % + 1 mg/ml	30 min	500 $\mu$ l	1

Tabelle 6.10: Ansätze zur enzymatischen Behandlung nach Entfernung der Retina mit einem Papainpuffer

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Papainpuffer	0,05 U	10 min	500 $\mu$ l	3
Papainpuffer	0,05 U	13min	500 $\mu$ l	3
Papainpuffer	0,1 U	5 min	500 $\mu$ l	3
Papainpuffer	0,1 U	6 min	500 $\mu$ l	1
Papainpuffer	0,1 U	7 min	500 $\mu$ l	9
Papainpuffer	0,1 U	8 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	10 min	500 $\mu$ l	3
Papainpuffer	0,1 U	13 min	500 $\mu$ l	12
Papainpuffer	0,1 U	14 min	500 $\mu$ l	3
Papainpuffer	0,1 U	15 min	500 $\mu$ l	40
Papainpuffer	0,1 U	15 min	1 ml	2
Papainpuffer	0,1 U	20 min	500 $\mu$ l	20

Fortsetzung nächste Seite...

... Fortsetzung

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Papainpuffer	0,1 U	25 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	30 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	30 min	1 ml	2
Papainpuffer	0,1 U	35 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	35 min	1 ml	2
Papainpuffer	0,1 U	37 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	37 min	1 ml	2
Papainpuffer	0,1 U	40 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,1 U	45 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	0,5 U	7 min	500 $\mu$ l	4
Papainpuffer	0,5 U	8 min	1 ml	2
Papainpuffer	0,5 U	30 - 35 min	1 ml	2
Papainpuffer	1 U	10 min	1 ml	4
Papainpuffer	1 U	15 min	1 ml	4
Papainpuffer	1 U	25 min	1 ml	52
Papainpuffer	1 U	10 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	1 U	5 min	500 $\mu$ l	1
Papainpuffer	2 U	10 - 15 min	500 $\mu$ l	1
Papainpuffer	2 U	10 min	500 $\mu$ l	1
Papainpuffer	2 U	12 min	500 $\mu$ l	2
Papainpuffer	2 U	13 min	500 $\mu$ l	1
Papainpuffer	2 U	15 min	500 $\mu$ l	1

Tabelle 6.11: Weitere Ansätze zur enzymatischen Behandlung nach Entfernung der Retina

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Acutase	250 $\mu$ l	10 min	1 : 1 mit PBS verdünnt	1
Acutase	500 $\mu$ l	5 min	500 $\mu$ l	5

Fortsetzung nächste Seite...

... Fortsetzung

Enzym	Konzentration	Dauer	Menge/Bulbus	n
Dispase	5 U	10 min	500 $\mu$ l	1
Dispase	10 U	20 min	500 $\mu$ l	1
Dispase, Trypsin	10 U, 0,1 %	25 + 30 min	500 $\mu$ l	2
Dispase, Trypsin, BSA	10 U, 0,1 %, 1 mg/ml	10 + 15 min	200 $\mu$ l, 5 $\mu$ l, 250 $\mu$ l	1

Tabelle 6.12: Ansätze zur Enzymatischen Behandlung vor und nach Entfernung der Retina

Enzym 1	Konzentration	Dauer	Enzym 2	Konzentration	Dauer	n
Dispase	50 U	5 min	Accutase		5 min	1
Dispase	50 U	5 min	Accutase		7,5 min	1
Dispase	50 U	4 min	Accutase		8 min	1
Dispase	50 U	5 min	Accutase		10 min	1
Dispase	50 U	10 min	Accutase		15 min	1
Dispase	50 U	5 min	Accutase		20 min	1
Dispase	50 U	10 min	Accutase		20 min	1
Dispase	5 U	7,5 min	Accutase		5 min	1
Trypsin	0.2 %	60 min	Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	10 min	14
Trypsin	0.2 %	60 min	Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	20 min	24
Trypsin	0.2 %	60 min	Collagenase 1a/4 2674	1 mg/ml	25 min	2
Trypsin	0.2 %	60 min	Collagenase Ia/4 2674	1 mg/ml	55 min	1
Dispase	10 U	15 min	Collagenase Ia/4 2674	1 mg/ml	55 min	1
Dispase	10 U	45 min	Trypsin	0.1 %	5 min	1
Dispase	10 U	25 min	Trypsin	0.1 %	20 min	1
Dispase	10 U	45 min	Trypsin	0.2 %	25 min	1
Dispase	10 U	45 min	Trypsin	0.2 %	30 min	1

## 6.2 Transepithelialer Widerstand

### Entwicklung des transepithelialen Widerstandes aller Unterkulturen

Der Median aller gemessenen Kulturen betrug nach 28 Tagen  $63,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der Mittelwert betrug  $58,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  mit einer Standardabweichung von  $16,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach 40 Tagen betrug der Median  $81,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der Mittelwert  $74,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einer Standardabweichung von  $21,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach 70 stieg der Median auf  $115 \Omega \cdot \text{cm}^2$  an, der Mittelwert betrug  $102,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einer Standardabweichung von  $34,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach 80 Tagen sank der Median auf  $112,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einem Mittelwert von  $102,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und einer Standardabweichung von  $39,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . 90 Tage nach Aussaat war der transepitheliale Widerstand im Median auf  $124,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$  angestiegen bei einem Mittelwert von  $108,4$  und einer Standardabweichung von  $44,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Tabelle 6.13: Entwicklung des transepithelialen Widerstandes aller Unterkulturen

Tage nach Aussaat	28	40	70	80	90	120
Mittelwert	$58,7 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$74,9 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$102,7 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$102,6 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$108,4 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$44,7 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$
Standard- abweichung	$16,2 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$21,4 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$34,6 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$39,3 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$44,5 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$27,2 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$
Median	$63,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$81,5 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$115,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$112,8 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$124,3 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$	$34,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^2}$

### Entwicklung des transepithelialen Widerstandes von 50 Kulturen

Die 50 angelegten Kulturen zeigten eine stetige Proliferation der RPE-Zellen. 28 Tage nach Aussaat betrug der Media transepitheliale Widerstand  $65,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der Mittelwert  $65,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und die Standardabweichung  $7,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . 40 Tage nach

Aussaat ist der Median transepitheliale Widerstand auf  $83,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$  angestiegen, bei einem Mittelwert von  $83,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und einer Standardabweichung von  $9,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . Nach 70 Tagen betrug der Median  $122 \Omega \cdot \text{cm}^2$  und der Mittelwert  $119,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$  bei einer Standardabweichung von  $14,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ . 80 Tage nach Aussaat stieg der Median auf  $126,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , der Mittelwert auf  $124,8$  und die Standardabweichung auf  $16,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

Tabelle 6.14: Entwicklung des transepithelialen Widerstandes von 50 Kulturen

Tage nach Aussaat	28	40	70	80	90
Mittelwert	$65,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$83,7 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$119,9 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$124,8 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$136,1 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$
Standard- abweichung	$7,3 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$9,9 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$14,1 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$16,7 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$16,5 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$
Median	$65,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$83,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$122,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$126,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$	$141,0 \frac{\Omega}{\text{cm}^{-2}}$

## 6.3 Abbildungen

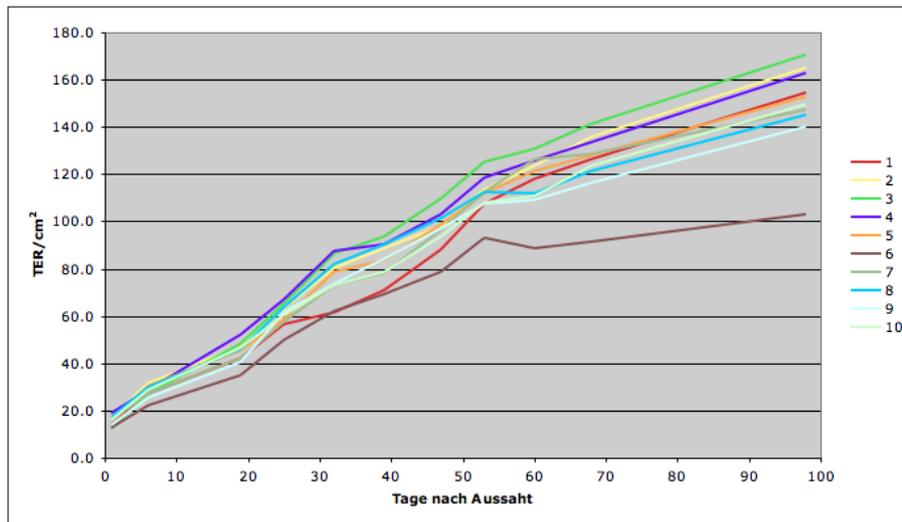


Abbildung 6.1: Verlauf des TER der Kulturen 1-10 in Abhängigkeit der Zeit nach Aussaat

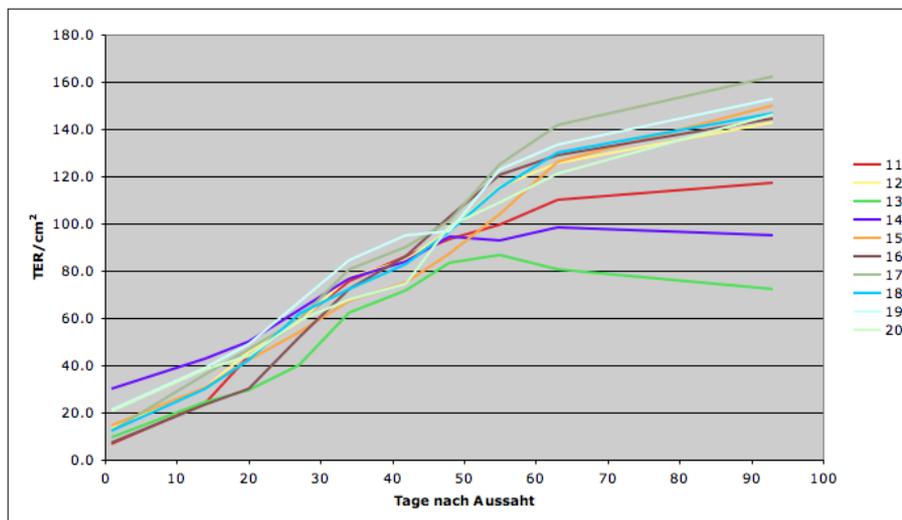


Abbildung 6.2: Verlauf des TER der Passagen der Kultur 2 in Abhängigkeit der Zeit nach Aussaat

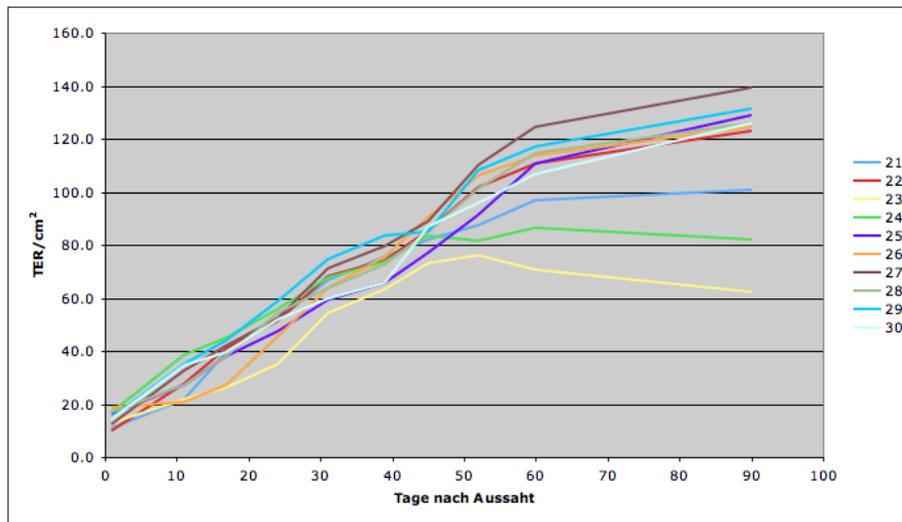


Abbildung 6.3: Verlauf des TER der Kulturen 21-30 in Abhängigkeit der Zeit nach Aussaat

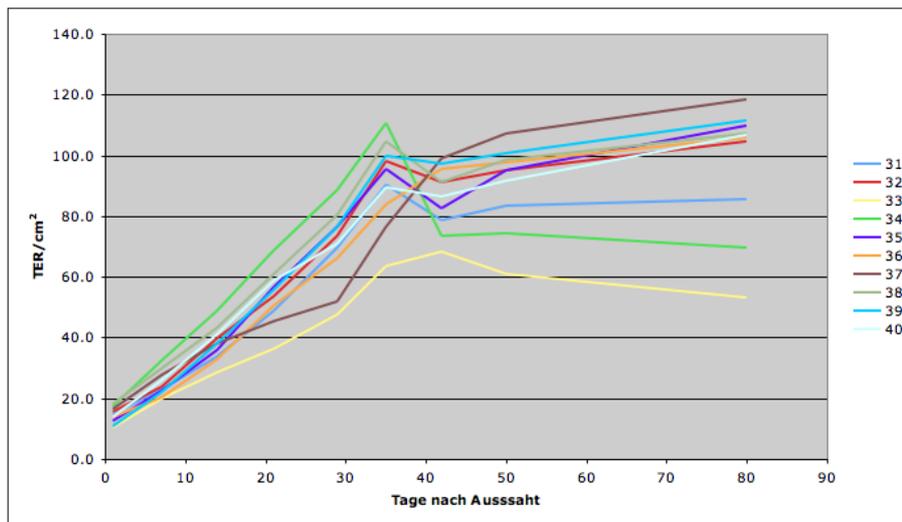
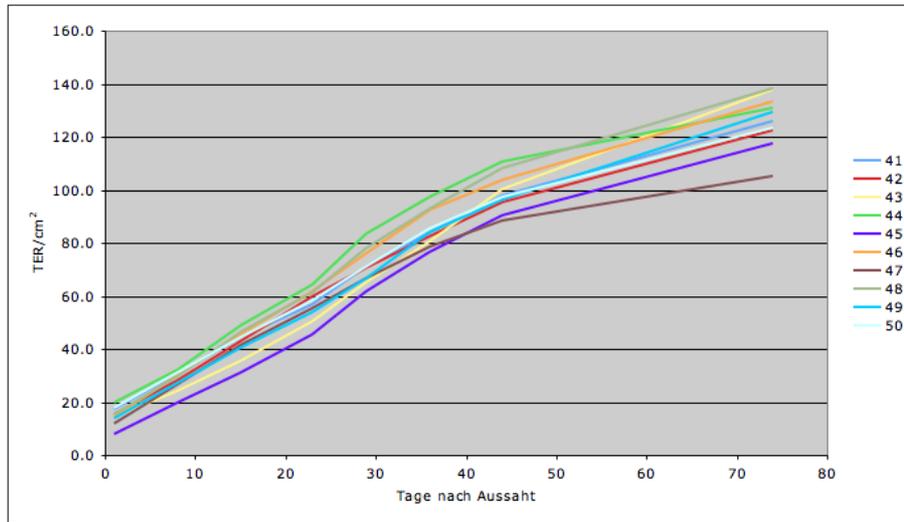


Abbildung 6.4: Verlauf des TER der Kulturen 31-40 in Abhängigkeit der Zeit nach Aussaat



(a) Kultur 6

Abbildung 6.5: Verlauf des TER der Kulturen 51-60 in Abhängigkeit der Zeit nach Aussaat

## 6.4 Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht bei einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe. Ich erkenne die Promotionsordnung für die Medizinische Fakultät der Universität Hamburg an.

## 6.5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BSA	bovines Serumalbumin
d	Tage
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F99	1:1 Mediummischung aus Hams F12 und Medium 199
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
h	Stunde(n) (engl. hours(s))
min	Minuten
OS	Photorezeptoraußensegmente (engl.: photoreceptor outer segments)
PBS	Phosphate-buffered saline-Dulbecco
PEDF	pigmentepithelialer Wachstumsfaktor
(f)RPE	(fetales) retinales Pigmentepithel
(h)RPE	(humanes) retinales Pigmentepithel
RPE	retinales Pigmentepithel
SD	Standardabweichung (engl. standard deviation)
sec	Sekunden (engl. second(s))
SEM	Standardfehler des Mittelwert (engl. standard error of the mean)
Tab.	Tabelle
TER	Transepithelialer Widerstand (engl. transepithelial resistance)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

## 6.6 Danksagung

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß für die freundliche Integration und die motivierende Arbeitsatmosphäre. Ein großer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Olaf Strauß, der mich erst im Rahmen der Universitätsklinik Hamburg (Experimentelle Ophthalmologie), dann quer durch Deutschland per email und Telefon zunächst vom Universitätsklinikum Regensburg aus und später von der Charité Berlin aus (Institut für klinische Physiologie, Charité Campus Benjamin Franklin) in und durch die Physiologie des RPE navigierte. Darüber hinaus bin ich ihm sehr dankbar für seine in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und Förderung. Ganz besonders herzlich möchte ich Dr. med. Mike Oliver Karl danken, der mir eine aktive wissenschaftliche Teilnahme und Freiheit von Anfang an ermöglichte. Seine großzügige Unterstützung quer durch die Welt, seine Begeisterungsfähigkeit und Diskutierfreudigkeit haben weit über die Grenzen dieser Arbeit wesentlich zum Gelingen meiner Promotion beigetragen. Für seine großzügige in jeder Hinsicht gewährte fachliche und menschliche Unterstützung kann ich mich gar nicht genug bedanken. Vielen lieben Dank! Danken möchte ich auch Frau Dr. med. Andrea Hassenstein für die Unterstützung meiner Arbeit und Dr. rer. nat. Sönke Wimmers für seine zahlreichen konstruktiven Hinweise während der experimentellen Ausarbeitung dieser Promotion. Meinen Eltern, Ursula und Michael Brolund möchte ich besonders danken für ihr unerschütterliches Vertrauen in mich und die damit verbundene Unterstützung sowie den persönlichen und finanziellen Rückhalt.

## 6.7 Lebenslauf

- Allan Brolund geboren am 09.09.1980 in Flensburg
- 2001 Abitur am Gymnasium Grootmoor in Hamburg
- 2002 Beginn des Medizinstudiums in Hamburg
- 2004 Beginn der Promotion bei Prof. Dr. Strauss in Hamburg
- 2005 Auslandsstudium an der Universität Claude Bernard, Lyon Frankreich
- 2008 Praktisches Jahr:  
Innere Medizin: Tauranga Hospital, Neuseeland und  
Gold Coast Hospital, Goldcoast, Australien.  
Pädiatrie: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und  
Kantonsspital Aarau, Schweiz.  
Chirurgie: Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika und  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- 2009 Abschluss des Medizinstudiums
- 2009 bis 2013 Assistenzarzt in der Pädiatrie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

# Literaturverzeichnis

- Ablonczy, Z. and Crosson, C. E. (2007). Vegf modulation of retinal pigment epithelium resistance. *Experimental eye research*, 85(6):762–771.
- Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Pearce-Kelling, S. E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A. M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature genetics*, 28(1):92–95.
- Adamis, A., Shima, D., Yeo, K.-T., Yeo, T., Brown, L., Berse, B., D'Amore, P., and Folkman, J. (1993). Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 193(2):631–638.
- Allikmets, R. (2000). Further evidence for an association of alleles with age-related macular degeneration. *The American Journal of Human Genetics*, 67(2):487–491.
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N. F., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., et al. (1997). A photoreceptor cell-specific atp-binding transporter gene (*abcr*) is mutated in recessive stargardt macular dystrophy. *Nature genetics*, 15(3):236–246.
- Ambati, J., Ambati, B. K., Yoo, S. H., Ianchulev, S., and Adamis, A. P. (2003). Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Survey of ophthalmology*, 48(3):257–293.
- Azarian, S. M. and Travis, G. H. (1997). The photoreceptor rim protein is an

- abc transporter encoded by the gene for recessive stargardt's disease (< i> abcr</i>). *FEBS letters*, 409(2):247–252.
- Baehr, W., Wu, S. M., Bird, A. C., and Palczewski, K. (2003). The retinoid cycle and retina disease. *Vision research*, 43(28):2957–2958.
- Besch, D., Jägle, H., Scholl, H. P., Seeliger, M. W., and Zrenner, E. (2003). Inherited multifocal rpe-diseases: mechanisms for local dysfunction in global retinoid cycle gene defects. *Vision research*, 43(28):3095–3108.
- Bok, D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *Journal of Cell Science*, 1993(Supplement 17):189–195.
- Chen, P., Hao, W., Rife, L., Wang, X. P., Shen, D., Chen, J., Ogden, T., Van Boemel, G. B., Wu, L., Yang, M., et al. (2001). A photic visual cycle of rhodopsin regeneration is dependent on rgr. *Nature genetics*, 28(3):256–260.
- Christen, W. G., Glynn, R. J., Manson, J. E., Ajani, U. A., and Buring, J. E. (1996). A prospective study of cigarette smoking and risk of age-related macular degeneration in men. *Jama*, 276(14):1147–1151.
- Dornonville, d. l. C. M. (1993). Ion transport in the retinal pigment epithelium. a study with double barrelled ion-selective microelectrodes. *Acta ophthalmologica. Supplement*, (209):1.
- Driessen, C. A., Winkens, H. J., Hoffmann, K., Kuhlmann, L. D., Janssen, B. P., Van Vugt, A. H., Van Hooser, J. P., Wieringa, B., Deutman, A. F., Palczewski, K., et al. (2000). Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. *Molecular and cellular biology*, 20(12):4275–4287.
- Dunn, K., Aotaki-Keen, A., Putkey, F., and Hjelmeland, L. (1996). Arpe-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research*, 62(2):155–170.
- Edwards, R. B. (1977). Accumulation of taurine by cultured retinal pigment epithelium of the rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 16(3):201–208.

- Fazzi, E., Signorini, S. G., Scelsa, B., Bova, S. M., and Lanzi, G. (2003). Leber's congenital amaurosis: an update. *European journal of paediatric neurology*, 7(1):13–22.
- Friedman, D. S., O'colmain, B., Munoz, B., Tomany, S., McCarty, C., De Jong, P., Nemesure, B., Mitchell, P., Kempen, J., et al. (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in the united states. *Arch. Ophthalmol.*, 122(4):564–572.
- Gallemore, R., Hernandez, E., Tayyanipour, R., Fujii, S., and Steinberg, R. (1993). Basolateral membrane cl-and k+ conductances of the dark-adapted chick retinal pigment epithelium. *Journal of neurophysiology*, 70(4):1656–1668.
- Geisen, P., McColm, J. R., King, B. M., and Hartnett, M. E. (2006). Characterization of barrier properties and inducible vegf expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Current eye research*, 31(9):739–748.
- Gibbs, D. and Williams, D. S. (2003). Isolation and culture of primary mouse retinal pigmented epithelial cells. In *Retinal Degenerations*, pages 347–352. Springer.
- Gonzalez-Fernandez, F., Kurz, D., Bao, Y., Newman, S., Conway, B. P., Young, J. E., Han, D. P., and Khani, S. C. (1999). 11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus. *Mol Vis*, 5:41.
- Hamann, S. (2002). Molecular mechanisms of water transport in the eye. *International review of cytology*, 215:395–431.
- Hartnett, M. E., Lappas, A., Darland, D., McColm, J. R., Lovejoy, S., and D'Amore, P. A. (2003). Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble vegf-dependent mechanism. *Experimental eye research*, 77(5):593–599.
- Hayashi, m., Asayama, K., and Ueno, S. (1978). Tissue culture of the retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmologica*, 56(1):83–94.

- Herrmann, P., Holz, F., and Issa, P. C. (2013). Ätiologie und pathogenese der altersabhängigen makuladegeneration. *Der Ophthalmologe*, 110(4):377–389.
- Hughes, B. A. and Steinberg, R. (1990). Voltage-dependent currents in isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *The Journal of physiology*, 428(1):273–297.
- Ishida, K., Panjwani, N., Cao, Z., and Streilein, J. W. (2003). Participation of pigment epithelium in ocular immune privilege. 3. epithelia cultured from iris, ciliary body, and retina suppress t-cell activation by partially non-overlapping mechanisms. *Ocular immunology and inflammation*, 11(2):91–105.
- Karl, M. O. (2006). Zur phagozytose durch retinale pigmentepithelzellen. *online, Hamburg, Univ., Diss., 2006*, online(1).
- Klein, R., Peto, T., Bird, A., and Vannewkirk, M. R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *American journal of ophthalmology*, 137(3):486–495.
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G., and Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *The Lancet*, 379(9827):1728–1738.
- Liu, Z., Meyer, C. H., Fimmers, R., and Stanzel, B. V. (2013). Indocyanine green concentrations used in chromovitrectomy cause a reversible functional alteration in the outer blood–retinal barrier. *Acta ophthalmologica*.
- Lund, R. D., Wang, S., Klimanskaya, I., Holmes, T., Ramos-Kelsey, R., Lu, B., Girman, S., Bischoff, N., Sauv e, Y., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell–derived cells rescue visual function in dystrophic rcs rats. *Cloning and stem cells*, 8(3):189–199.
- Maminishkis, A., Chen, S., Jalickee, S., Banzon, T., Shi, G., Wang, F. E., Ehalt, T., Hammer, J. A., and Miller, S. S. (2006). Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(8):3612–3624.
- Marmor, M. F. (1999). Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Documenta Ophthalmologica*, 97(3-4):239–249.

- Marmorstein, L. Y., Wu, J., McLaughlin, P., Yocom, J., Karl, M. O., Neussert, R., Wimmers, S., Stanton, J. B., Gregg, R. G., Strauss, O., et al. (2006). The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1). *The Journal of general physiology*, 127(5):577–589.
- Mayerson, P. L. and Hall, M. O. (1986). Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro. *The Journal of cell biology*, 103(1):299–308.
- Miller, S. S. and Edelman, J. L. (1990). Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *The Journal of Physiology*, 424(1):283–300.
- Neussert, R., Müller, C., Milenkovic, V. M., and Strauß, O. (2010). The presence of bestrophin-1 modulates the  $ca^{2+}$  recruitment from  $ca^{2+}$  stores in the er. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 460(1):163–175.
- Peng, S., Rahner, C., and Rizzolo, L. J. (2003). Apical and basal regulation of the permeability of the retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(2):808–817.
- Phelan, J. K. and Bok, D. (2000). A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis*, 6:116–124.
- Reynolds, R., Rosner, B., and Seddon, J. M. (2010). Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 117(10):1989–1995.
- Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M. M., and Dryja, T. P. (2002). Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Human Molecular Genetics*, 11(10):1219–1227.
- Sandberg, M. A., Tolentino, M. J., Miller, S., Berson, E. L., and Gaudio, A. R. (1993). Hyperopia and neovascularization in age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, 100(7):1009–1013.
- Schlichtenbrede, F., da Cruz, L., Stephens, C., Bainbridge, J., Salt, T., and Ali, R. (2002). Improvement of neuronal visual responses in the superior colliculus

- in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 43(12):4603.
- Schmitz, S. (2011). Zellkulturen, zelllinien und deren einsatzmöglichkeiten. In *Der Experimentator: Zellkultur*, pages 71–86. Springer.
- Scholl, H. P., Fleckenstein, M., Issa, P. C., Keilhauer, C., Holz, F. G., and Weber, B. H. (2007). An update on the genetics of age-related macular degeneration. *Molecular vision*, 13:196.
- Seddon, J. M., Cote, J., and Rosner, B. (2003). Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Archives of Ophthalmology*, 121(12):1728–1737.
- Shirasawa, M., Sonoda, S., Terasaki, H., Arimura, N., Otsuka, H., Yamashita, T., Uchino, E., Hisatomi, T., Ishibashi, T., and Sakamoto, T. (2013). Tnf- $\alpha$  disrupts morphologic and functional barrier properties of polarized retinal pigment epithelium. *Experimental eye research*.
- Smith, W., Assink, J., Klein, R., Mitchell, P., Klaver, C. C., Klein, B. E., Hofman, A., Jensen, S., Wang, J. J., and de Jong, P. T. (2001). Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology*, 108(4):697–704.
- Stanzel, B. V., Espana, E. M., Grueterich, M., Kawakita, T., Parel, J.-M., Tseng, S. C., and Binder, S. (2005). Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelial cells in culture. *Experimental eye research*, 80(1):103–112.
- Steinberg, R. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*, 60(4):327–346.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3):845–881. PMID: 15987797.
- Streilein, J. W., Ma, N., Wenkel, H., Fong Ng, T., and Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision research*, 42(4):487–495.

- Thompson, D. A. and Gal, A. (2003). Vitamin a metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Progress in retinal and eye research*, 22(5):683–703.
- Thompson, D. A., McHenry, C. L., Li, Y., Richards, J. E., Othman, M. I., Schwinger, E., Vollrath, D., Jacobson, S. G., and Gal, A. (2002). Retinal dystrophy due to paternal isodisomy for chromosome 1 or chromosome 2, with homoallelism for mutations in *rpe65* or *mertk*, respectively. *The American Journal of Human Genetics*, 70(1):224–229.
- Weng, J., Mata, N. L., Azarian, S. M., Tzekov, R. T., Birch, D. G., and Travis, G. H. (1999). Insights into the function of rim protein in photoreceptors and etiology of stargardt’s disease from the phenotype in *abcr* knockout mice. *Cell*, 98(1):13–23.
- Woodruff, M. L., Wang, Z., Chung, H. Y., Redmond, T. M., Fain, G. L., and Lem, J. (2003). Spontaneous activity of opsin apoprotein is a cause of leber congenital amaurosis. *Nature genetics*, 35(2):158–164.
- Yamamoto, H., Simon, A., Eriksson, U., Harris, E., Berson, E. L., and Dryja, T. P. (1999). Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nature genetics*, 22(2):188–191.