

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

**Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung limbalen
kornealer Epithelzellen von Spenderhornhäuten**

Dissertation

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

Vinodh Kakkassery

aus Salzkotten, Deutschland

Hamburg 2005

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
BrdU	5-Brom-2' -desoxy Uridin
CPD	kumulativen Populationsverdoppelung
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum (fetal calf serum)
g	Erdbeschleunigung
LSAB	Streptavidin konjugiertes Biotin (Labelled- Streptavidin Biotin)
PBS	Phosphat- gepufferte Lösung (phosphat buffered solution)
PD	Populationsverdoppelung

I. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
II. Einleitung	2
1. Das Auge	2
1.1 Aufbau des Auges	2
1.2 Funktionen der Bestandteile des Auges und seiner Hilfsorgane	4
2. Die Hornhaut	5
3. Proliferation und Differenzierung des kornealen Epithels	7
4. Das Limbusstammzelldefizit und seine Therapieformen	10
5. Zelllabor	14
6. Ziel	16
III. Material und Methoden	18
1. Material	18
1.1 Chemikalien	18
1.2 Geräte	19
1.3 Material zur Gewinnung von humanen kornealen Epithelzellen	20
2. Methoden	20
2.1 Medium zur Kultivierung von humanen kornealen Epithelzellen	20
2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen kornealen Epithelzellen	21
2.3 Umsetzen von humanen, kornealen Epithelzellen	21
2.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer	22
2.5 Immunzytochemische Färbungen	23
2.6 Fuchsinfärbung mit einem LSAB-System der Firma DAKO	24
2.7 Proliferationstest mit Bromdesoxyuridin	25
2.8 Quantitative Untersuchung der Zellproliferation und Erstellung einer Wachstumskurve	25

2.9 Kryokonservierung von humanen korneale Epithelzellen in flüssigem Stickstoff bei –196° C	26
IV. Ergebnisse	27
1. Lichtmikroskopische Untersuchungen	27
2. Quantitative Untersuchung des Proliferationsverhaltens der limbalen kornealen Epithelzellen	32
3. Immunzytochemische Untersuchungen auf Matrixproteine der kornealen Epithelzellen	33
4. Proliferationstest mit Bromdesoxyuridin	36
V. Diskussion	39
VI. Zusammenfassung	45
VII. Literatur	46

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Das Limbusstammzelldefizit reduziert oder verhindert die Regeneration des kornealen Epithels. Folgen dieser Erkrankung sind eine ungenügende Reepithelialisierung und bei schwereren Verläufen eine Vaskularisation, Vernarbung und Ersatz des Hornhautepithels mit fibrovaskulärem Pannus. Die hierdurch fehlende Transparenz der Hornhaut führt zur Sehinderung oder Erblindung. Neben der Limbusstammzelltransplantation, bei der von einem Partnerauge oder einem Spenderauge Transplantate aus der Limbusregion der Hornhaut gewonnen und auf das geschädigte Auge gebracht werden, wurde in letzter Zeit eine neue Methode der Transplantation von limbalen kornealen Epithelzellen auf Amnionmembran beschrieben. Verschiedene Forschungsgruppen transplantierten Limbusstammzellen auf Amnionmembran, indem Gewebstücke aus der Limbusregion auf die Membran gebracht wurden. Nachteil dieser Methode war, dass sich nur eine geringe Anzahl an Zellen auf der Membran wiederfand und dementsprechend bei stark ausgeprägten Limbusstammzellinsuffizienzen der Therapieerfolg gering war. Zudem wurde postuliert, dass nur Limbusepithelzellen von jungen Spenderaugen mit kurzen Postmortem- Zeiten für diese Methode verwendbar sind. Damit sind diese Konstrukte nur eingeschränkt verfügbar. In diesen Experimenten wurde die Möglichkeit untersucht, limbale korneale Epithelzellen von organkultivierten Spenderhornhäuten oder Skleralringen, die nach der Korneatransplantation zur Verfügung stehen, zu isolieren, zu kultivieren und hinsichtlich verschiedener Zellmarker und ihres Proliferationsverhaltens zu charakterisieren. Vorteil dieser Methode ist eine höhere Verfügbarkeit von Material zur Gewinnung von Epithelzellen. In dieser Arbeit wurde eine Kultivierungsmethode von limbalen kornealen Epithelzellen etabliert, die es ermöglicht, diese Zellen von organkultivierten Zellen zu gewinnen und somit die Anzahl der Behandlungserfolge von Patienten mit Limbusstammzelldefizit in naher Zukunft zu erhöhen.

II. Einleitung

1. Das Auge

1.1 Aufbau des Auges

Das Auge ist ein optisches System, das sich aus mehreren Funktionsbestandteilen zusammensetzt. Es werden funktionelle Einheiten unterschieden, solche, die die Weiterleitung des Lichts gewährleisten, die für die Umsetzung eines Lichtreizes in einen elektrischen Reiz benötigt werden, die die Versorgung des Gewebes gewährleisten oder die stabilisierende oder schützende Aufgaben übernehmen. Häufig erfüllen anatomische Bestandteile des Auges mehrere Aufgaben.

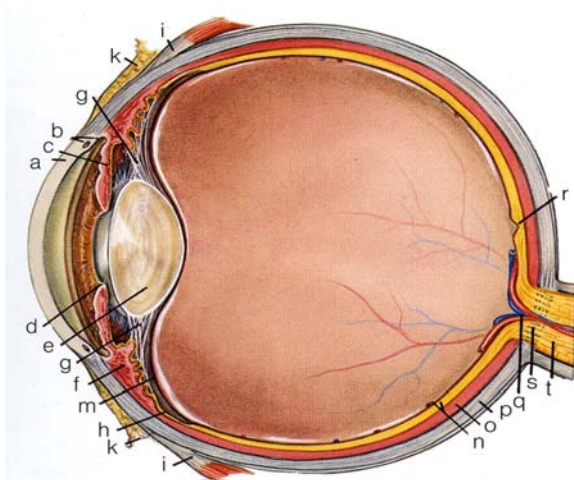


Abb. 1: Längsschnitt durch das Auge. **a** Hornhaut (Kornea); **b** Kammerwinkel mit Schlemmschem Kanal; **c** Regenbogenhaut (Iris) mit radiären und zirkulären Muskelfasern; **d** Pupille; **e** Linse; **f** Ziliarkörper (Corpus ciliare) mit dem M. ciliaris; **g** Zonulafasern (Zonula ciliaris, Zonula Zinnii, Aufhängeapparat der Linse); **h** Pars plana der Netzhaut; **i** Augenmuskelansätze; **k** Bindehaut (Konjunktiva); **m** Glaskörpergrenzmembran; **n** Netzhaut (Retina) mit ihren Gefäßen; **o** Aderhaut (Chorioidea); **p** Lederhaut (Sklera); **q** A. et V. centralis retinae; **r** Makula; **s** Lamina cribrosa; **t** Sehnerv (Fasciculus opticus)

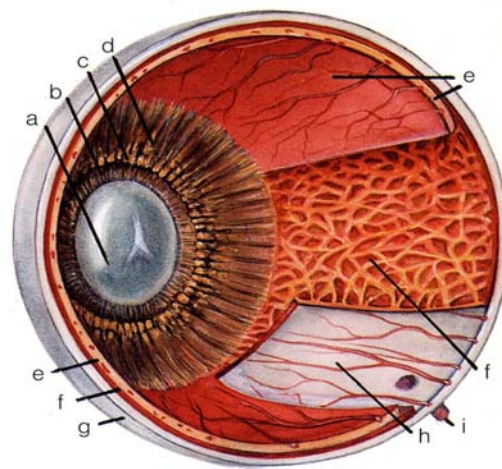


Abb. 2: Querschnitt durch das Auge (Blick von hinten). **a** Linse; **b** Zonulafasern (Zonula ciliaris, Zonula Zinnii, Aufhängeapparat der Linse); **c** Ziliarkörperzotten; **d** Ziliarkörper (Corpus ciliare); **e** Netzhaut (Retina); **f** Aderhaut (Chorioidea); **g** und **h** Lederhaut (Sklera); **i** Vortexvene

Abbildung: 1.1 schematische Zeichnung des Auges, Duale Reihe, Augenheilkunde,

1. Auflage, S. 25

Das Auge ist in die Orbita eingebettet. Innerhalb eines weichen Fettpolsters (Corpus adiposum orbitae) ist der Augapfel (Bulbus oculi) eingelagert. Die Bewegungen des Augapfels werden durch sechs äußere Augenmuskeln, die an der Lederhaut des Augapfels aufgehängt sind, ermöglicht. Die äußere Hilfsorgane sind die Lider, die Bindehaut und verschiedenste Drüsen, wie z. B. die Tränendrüse.

Die äußere Augenhaut (Tunica externa bulbi) besteht aus der Lederhaut (Sklera) und Teilen der Hornhaut (Kornea). Die Sklera hat eine derbe Faserstruktur, die als bindegewebiges Skelett die äußere Form des Augapfels sichert. Die Kornea ist transparent und liegt am anterioren Ende des Augapfels. Die mittlere Augenhaut bildet die Gefäßhaut (Tunica vasculosa bulbi, Uvea). Den vorderen Abschnitt der Uvea bildet die Regenbogenhaut (Iris), die die Grenzen der runden Pupille bildet. Ungefähr auf der Höhe, in der die Lederhaut in die Hornhaut übergeht, verdickt sich die Iris zum Ziliarkörper. Im Ziliarkörper ist auch der Ziliarmuskel zu finden. Die Aderhaut ist der hintere Anteil der Uvea. Die Netzhaut mit dem Stratum nervosum und dem Stratum pigmentosum retinae bildet die innere Augenhaut (Tunica interna sensoria bulbi). Die Nervenfasern der Rezeptoren werden über die Papille zum Nervus opticus in die Areale des Großhirns, die für die Bearbeitung der Sehinformationen verantwortlich sind, weitergeleitet. Ebenso treten über die Papille die arteriellen und venösen Gefäße ein und aus. Lichtbrechende Medien sind Inhalt des Augapfels. Die Linse ist durch Strahlenbändchen (Zonula ciliaris) am Ziliarkörper aufgehängt. Der zähflüssige, gelatineartige Glaskörper (Corpus vitreum) füllt den Raum hinter der Linse aus. Die vordere Augenkammer (Camera anterior) ist der Raum zwischen Hornhaut, Linse und Iris. Die hintere Augenkammer (Camera posterior) erstreckt sich von der Irisrückfläche bis zur Vorderfläche des Glaskörpers. Beide Kammern sind mit Kammerwasser gefüllt. Abbildung 1.1 zeigt eine schematische Darstellung des Auges im Querschnitt.

1.2 Funktionen der Bestandteile des Auges und seiner Hilfsorgane

Die Orbita bietet dem Augapfel einen Schutz bezüglich exogener Einflüsse, wie beispielsweise einem Trauma. Ein Fettpolster (Corpus adiposum orbitae) ermöglicht mit Hilfe der äußeren Augenmuskeln die Beweglichkeit des Augapfels. Die Lider, der Tränenfilm und andere Hilfsstrukturen dienen dem Schutz des Auges und haben zum Teil ernährende Funktionen. Die Sklera und die Hornhaut sorgen als äußere Grenzen des Augapfels für eine stabile äußere Form und stellen eine Barriere für exogene Einflüsse dar. Die Hornhaut gewährleistet aufgrund ihrer transparenten Eigenschaft den Eintritt des Lichtes in das Auge. Hierbei sorgt sie durch ihre nach außen hin konvexe Form und durch ihre Medienbeschaffenheit für eine Beugung des Lichtes, die für die Darstellung einer scharf wahrnehmbaren Abbildung auf der Netzhaut notwendig ist. Die mittlere Augenhaut (Uvea) stellt als gefäßreiche Struktur die arterielle und venöse Versorgung sicher. Ihr vorderer Anteil, die Iris, führt zudem die Funktion einer Blende aus, die mit dem Ziliarmuskel je nach Umgebungshelligkeit kleiner und größer gestellt wird. Die innere Augenhaut, die Netzhaut, verarbeitet den Lichtreiz in einen elektrischen Reiz, der über den Sehnerv in das Gehirn weitergeleitet und dort verarbeitet wird. Die Linse kann ihre Form durch Zug des Ziliarmuskels oder durch Nachlassen des Muskels und der Eigenelastizität verändern und stellt so eine Sammellinse mit variabler Brechkraft dar. Sie ermöglicht die Darstellung von Objekten auf der Netzhaut aus dem Nahbereich wie aus dem Fernbereich des Sehens. Der Glaskörper wirkt stabilisierend auf den Augapfel. Er ist zudem transparent und stellt im physiologischen Zustand keine Barriere für die Darstellung von Objekten auf der Netzhaut dar.

2. Die Hornhaut

Die Hornhaut zeichnet sich durch eine gleichmäßige Feinstruktur aus. Ihre Oberfläche bildet eine gewölbte Ellipse. Die Hornhaut ist in ihrer Form stärker gekrümmt als die Sklera, mit der sie zusammen den Augapfel bildet. Die Hornhautdicke nimmt vom Zentrum zum Limbus hin zu.

Sie besteht aus mehreren Schichten: dem Endothel, der Descemet-Membran, dem Stroma, der Bowman-Lamelle und dem Epithel.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit bezieht sich auf die äußere Schicht der Hornhaut. Die Epithelschicht mit ihrer begrenzenden Struktur, der Bowman-Lamelle, soll an dieser Stelle dieser näher betrachtet werden. Die zellfreie Bowman-Lamelle besteht ausschließlich aus kollagenen Fasern als Grundsubstanz, die klein, lose gebündelt und regelmäßig angeordnet sind.

Das Epithel ist ein nicht verhorntes, fünf- bis sechsschichtiges Plattenepithel mit einer hohen Mitoserate. Der Umsatz des gesamten Epithels beträgt etwa fünf bis sieben Tage. Die oberflächlichen Zellen weisen auf ihrer vorderen Zellmembran multiple Mikrovilli und Mikroplakae auf. Die Tight Junctions, wichtig für Ionenflußgesteuerte Prozesse, liegen am Rand der Zellmembran und bilden eine Barriere zwischen den Epithelzellen der Hornhaut. Die Flügelzellen im Epithel zeichnen sich durch eine große Anzahl von Tonofilamenten, Desmosomen und Gap Junctions aus. Die basalen Epithelzellen sind an der 48 nm dicken, glatten Basalmembran mit Hemidesmosomen befestigt. Man findet zwischen den Epithelzellen der Hornhautperipherie pigmentierte Melanozyten und Langerhanszellen vom Typ der dendritischen Zellen. Gemeinsam mit der Limbusregion der oberflächlichen Kornea und dem konjunktivalen Epithel bildet das korneale Epithel die okuläre epitheliale Oberfläche. Das konjunktivale Epithel unterscheidet sich vom kornealen Epithel durch eine geringere Anzahl von Zellschichten (ein bis zwei Schichten)

und andersartigen Zellkontaktproteinen. Typisch für diese Region sind die Goblet Cells. Das Epithel der Limbusregion besteht aus 10 Lagen und stellt mikroskopisch und von seinem Proteinexpressionmuster her gesehen eine Wechselregion zwischen dem kornealen und konjunktivalen Gewebe dar. Charakteristisch für diese Region sind die sogenannten melaninhaltigen Palisaden von Vogt.

Die Hornhaut hat in Interaktion mit dem Tränenfilm als Hauptaufgabe eine Schutzfunktion für das Auge. Außerdem ermöglicht sie den Lichteintritt in das Auge, die das Sehen ermöglicht. Einzelne Teile des Tränenfilms und der einzelnen Hornhautschichten sind für die Versorgung der Kornea verantwortlich. Die Hornhaut hat zudem die Eigenschaft einer starren Linse und spielt damit eine wichtige Rolle in der ausreichend genauen Objektabbildung auf der Netzhaut.

Störungen der Hornhaut werden von Patienten häufig deutlich wahrgenommen und kleine Hornhautbefunde können zu starken Sehbeeinträchtigungen führen. Eine Störung der Epithelwundheilung wird nach einer Schädigung des Hornhautepithels und der Basalmembran gesehen. Es erfolgt eine schnelle Reepithelisierung. Die Anheftung an das Stroma ist jedoch verzögert. Sie kann über mehrere Monate erfolgen. Bei dem kleinsten Trauma, z. B. durch Lidschlag, kann erneut eine Abradierung der Zellen geschehen.

Die Erkrankungen der Hornhaut werden in kongenitale oder konnatale Veränderungen, in Degenerationen, Dystrophien und in erworbene Erkrankungen eingeteilt.

Kongenitalen und konnatalen Veränderungen zeichnen sich durch einen abnormen Durchmesser und eine abnorme Form der Hornhaut aus. Eine kongenitale Trübung (z.B. bei Leukome), Descemet-Leisten oder andersartige Korneaveränderungen (z.B. nach Zangengeburt) oder Dermoide sind Beispiele hierfür. Degenerative Prozesse unterschiedlicher Arten sind bekannt. Sie können altersbedingt sein und sich infolge von Ablagerungen bilden, oberflächlicher Art (z.B. durch einen insuffizienten Tränenfilm) sein oder infolge von generalisierten Erkrankungen entstehen. Hereditäre

Hornhauterkrankungen (Dystrophien) sind erblich bedingte Erkrankungen. Zu ihnen werden auch die Ektasien und die metabolischen Stoffwechselerkrankungen der Hornhaut hinzugezählt. Bei den erworbenen Erkrankungen spielen in erster Linie die Keratiden eine Rolle. Sie können durch unterschiedlichste exogene Erreger hervorgerufen werden, die sämtliche Schichten der Hornhaut durchdringen können. Weitere wichtige klinisch morphologische Veränderungen der Hornhaut sind das Ödem, das unter anderem durch eine zu geringe Endothelzellichte verursacht werden kann, und die Vaskularisation der Kornea, auf die hier im Einzelnen nicht eingegangen werden sollen.

Das Limbusstammzelldefizit als degenerative Erkrankung des kornealen Epithels steht im Blickpunkt dieser Arbeit und wird im Weiteren genauer erklärt. Wichtig sind hierfür Vorkenntnisse über die Regenerations- und Proliferationsfähigkeit des Epithels, die im Folgenden dargestellt werden.

3. Proliferation und Differenzierung des kornealen Epithels

Seit mehreren Jahrzehnten wird in der Forschung das wissenschaftliche Phänomen der Proliferation mit der Existenz einer Stammzelle erklärt. Schon Anfang der fünfziger Jahre beschäftigten sich hämatologische Forschungsgruppen mit Theorien der Stammzellen. Aufgrund neuer Erkenntnisse der Stammzellforschung wird der Begriff der Stammzelle heute jedoch weitaus differenzierter verwendet. Daher soll im Folgenden kurz dargestellt werden, in welchem Sinne der Begriff der Stammzelle in Rahmen dieser Arbeit verwendet wird.

Die Differenzierung in andere Zellen und die Selbsterneuerung sind Eigenschaften der Stammzelle. Heute wird weitgehend unterschieden zwischen totipotenten, pluripotenten und gewebsspezifischen Stammzellen und Zellen ohne Stammzeleigenschaften, den Progenitorzellen und den differenzierten Zellen.

Die totipotente Stammzelle hat keine zyklusabhängige Einschränkung bezüglich ihrer Teilungsfähigkeit. Man spricht in ihrem Zusammenhang von echten Stammzellen. Sie ist in der Lage, einen ganzen Organismus zu bilden und kann sich in jede Zelle differenzieren. Nur Zygoten und frühe Blastomere haben totipotent Eigenschaften. Die pluripotente und sich selbst erneuernde Stammzelle hat ebenfalls keine zyklusabhängige Einschränkung bezüglich ihrer Teilungsfähigkeit. Sie ist in der Lage, sich in alle Zelltypen zu differenzieren, kann aber nicht ganze Organismen bilden und unterscheidet sich dadurch von totipotenten Stammzellen. Die gewebsspezifische Stammzelle ist nicht in der Lage, sich in alle Zellen zu differenzieren. Ihre Aufgabe ist die Aufrechterhaltung des Systems eines Organs. Die Progenitorzelle ist keine Stammzelle. Sie hat eine begrenzte proliferative Fähigkeit und auch ihre Differenzierung in funktionale Zellen ist eng umschrieben. Jedoch zeigt sie eine wesentlich höhere mitotische Umsatzrate auf als die multi- und totipotenten Zellen der höheren Ebenen.

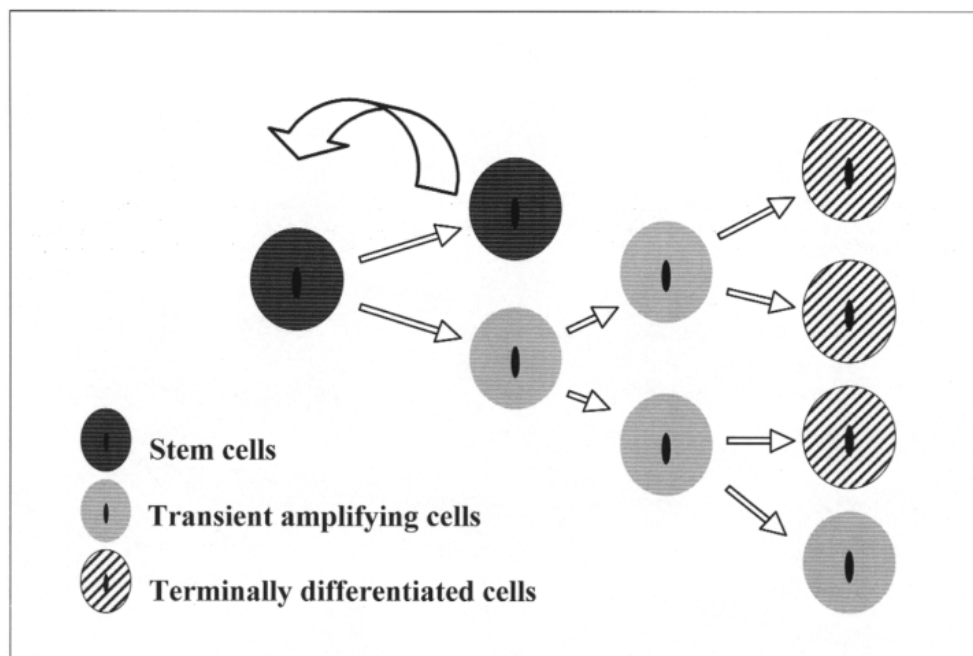


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Beziehung zwischen Stammzellen, Progenitorzellen und terminal differenzierten Zellen.

Die differenzierte Zelle ist die funktionale Zelle, die jedoch keine mitotische Aktivität und keine weitere Differenzierung erfährt. Die Regeneration des Hornhautepithels wird zur Zeit mit der Anwendung der Stammzellen- Theorie beschrieben. Wie vorher beschrieben ist das Epithel ein nicht verhorntes, fünf- bis sechsschichtiges Plattenepithel mit einer hohen Mitoserate (der Umsatz des gesamten Epithels beträgt etwa fünf bis sieben Tage). 1983 stellte Thoft, R.A. et Friend, J. die X,Y,Z-Hypothese des kornealen epithelialen Erhalts auf. Die allgemeine Lehrmeinung beruft sich heutzutage auf diese These. Die epitheliale Stammzelle wird demnach in der limbalen basalen Epithelschicht vermutet. Es handelt sich hierbei um eine undifferenzierte pluripotente Stammzelle, die eine wichtige Quelle für neues korneales Epithel darstellt. Wenn die Zellen in Progenitorzellen differenzieren, erfolgt eine zentripetale Wanderung der Zellen zur Mitte der Hornhaut. Im zentralen Bereich findet eine Differenzierung der Zellen in Basalzellen des Epithels statt. X wird das Phänomen der Proliferation genannt. Y ist das Wandern der Zellen zum Zentrum hin. Z steht für den Zellverlust im kornealen Epithel durch Zelluntergänge.

In der Literatur wird in diesem Zusammenhang von Limbusstammzellen gesprochen. Bis jetzt ist es jedoch noch nicht gelungen, die pluripotenten Stammzellen nachzuweisen. Häufig konnten proliferierende limbale korneale Epithelzellen in Kultur gebracht werden, jedoch konnte nicht unterschieden werden, ob es sich bei den in Kultur gebrachten Zellen um Stammzellen oder Progenitorzellen handelt. Bis jetzt sind keine spezifischen Marker für die einzelnen Unterteilungen der Stammzelle und zur Abgrenzung zur Progenitorzelle bekannt. Proteine wie KI 67 oder Cytoskeletin oder DNS- Sequenzen 5-Brom-2'-desoxy Uridin oder Thyrimidin erlauben eine Untersuchung der Proliferation von Zellen. Eine Einstufung kann daher nur durch das Wachstumsverhalten der Zellen erfolgen. Ziel der Arbeit ist es, eine hinreichende Charakterisierung bezüglich Proliferationsverhalten der von der Kornea isolierten Zellen vorzunehmen und dementsprechend ein Verhalten zu beschreiben, dass entweder Stammzellen oder Progenitorzellen ähnelt.

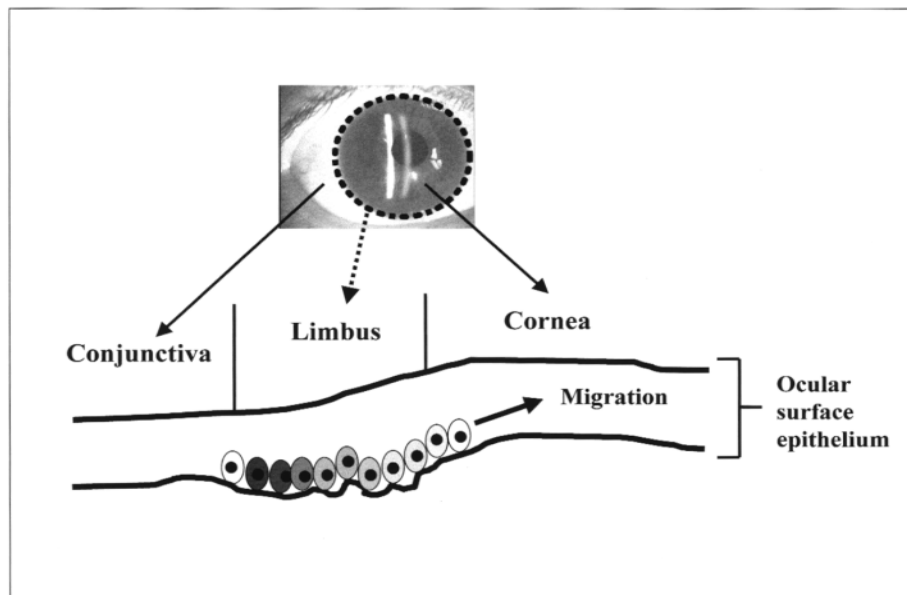


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Limbusregion mit Migration der Epithelzellen

4. Das Limbusstammzelldefizit und seine Therapieformen

Die Regeneration des Hornhautepithels macht die wichtige Funktion der Limbusregion deutlich. Daher können Erkrankungen der Limbusregion der Hornhaut die Versorgung mit neuen kornealen Epithelzellen stark beeinträchtigen. Das Limbusstammzelldefizit und eine damit einhergehende fehlende Regeneration des Hornhautepithels können zu persistierenden Defekten und Erosionen, einer kornealen Vaskularisation, Vernarbungen und einer Konjunktivierung der Hornhaut führen. Beweisend für eine Konjunktivierung der Hornhaut und damit auch eines Stammzelldefizits ist der Nachweis von Globlet Cells. Diese Zellen sind typischerweise im konjunktivalen Epithel zu finden. Ursachen für diese Erkrankung können chemische und hitzebedingte Verletzungen, das Stevens-Johnson-Syndrom, verschiedene chirurgische Eingriffe, Kontaktlinsenverletzungen, die Aniridie, verschiedenste endokrine Defizite oder idiopathische Natur sein.

Eine Form der Therapie stellt die Limbusstammzelltransplantation dar. Nach einer eventuellen notwendigen Entfernung von Veränderungen auf der Hornhaut, wie z.B. konjunktivales Gewebe auf der Hornhaut, wird von dem gesunden Partnerauge oder einem Spenderauge ein Gewebestück oder ein Ring aus der Limbusregion frei präpariert und auf die Limbusregion des betroffenen Auges festgenäht. Man erhofft sich durch diese Prozedur eine erneute regenerative Kapazität des Hornhautepithels des geschädigten Auges und eine Barrierenfunktion zur benachbarten Bindehaut. Es zeigten sich im klinischen Alltag zum Teil nicht sehr befriedigende Verläufe mit einer zeitlich begrenzten Wiederherstellung der visuellen Fähigkeiten. Dua und andere (2000) konnten in einem Case- Report zwar über sechs Patienten mit einem gutem, langfristigen Behandlungserfolg und einer deutlichen Verbesserung des Visus nach einer Limbusstammzelltransplantation berichten. Jedoch ließen sich keine weiteren positiven Berichte mit Langzeitwirkung recherchieren. Zudem ist der Einsatz dieser Methode dann limitiert, wenn das Partnerauge auch mitbetroffen ist oder das verletzte Auge große Mengen an Spendermaterial benötigt, was vom Partnerauge nicht zu gewinnen ist. Eine Alternative stellt die Verwendung von Limbuspräparaten aus dem Spenderauge dar. Jedoch sind nicht immer geeignete Spenderaugen vorhanden, bzw. noch nicht ausreichend untersucht worden, welche Auswahlkriterien relevant für den therapeutischen Erfolg sind. Zurzeit wird häufig ein Vergleich der HLA-Typisierung zwischen Spender und Empfänger durchgeführt. Dieses führt jedoch zu einer verminderten Verfügbarkeit an Spenderaugen und einer reduzierten Möglichkeit einer Planung einer Operation. Es wird weiterhin postuliert, dass der Zeitraum zwischen der Zellspende und dem Todeszeitraum des Spenders nur sehr kurz sein sollte, d.h. dass „frisches“ Gewebe transplantiert werden sollte. Die Kombination dieser Anforderungen machen es praktisch unmöglich, eine adäquate Versorgung der Patienten sicher zu stellen. Daher ist es notwendig, die Bereitstellung von Zellen und Geweben methodisch zu verbessern. Schon seit längerer Zeit werden daher Methoden zur

Verbesserung der Limbusstammzelleninsuffizienztherapie untersucht und weiterentwickelt. Erste Tierversuche zur Untersuchung von limbalen kornealen Epithelzellen wurden von Castro-Munozledo et al. (1997) unternommen. Es wurden korneale Epithelzellen von Kaninchen gewonnen und auf einer letal geschädigten 3T3-Fibroblastenbeschichtung mit einem serumfreien Medium in Kultur gebracht. Kolonien bildeten sich schnell. Es wurden Zellen aus dem Zentrum, der Peripherie und der Limbusregion gewonnen und in Kultur gebracht. In allen drei Regionen wurden Kulturen gewonnen, wobei sich Zellen aus der Limbusregion durch eine höhere Proliferationsrate auszeichneten als die Zellen aus dem Zentrum und der Peripherie der Hornhaut. Eine weitere Arbeit mit humanem Gewebe folgte von Pellegrini et al. (1997). Ziel dieser Arbeit war es, limbale korneale Epithelzellen zu kultivieren und sie mit Hilfe einer Kontaktlinse auf alkaliverbrannte Augen aufzutragen. Es zeigten sich bei den zwei Testpersonen nach dieser Prozedur im Langzeitverlauf eine Stabilität des regenerativen kornealen Epithels und eine deutliche Verbesserung des Patientenbefinden und der Sehfähigkeit.

Eine Alternative zu diesem Eingriff stellt die Verwendung von Amnionmembran dar. Die Amnionmembran wird klinisch als natürliche Matrix erfolgreich nach der Exzision von großen konjunktivalen Läsionen wie z.B. bei Pterygien und Tumoren zur Rekonstruktion der Oberfläche eingesetzt. Sie findet auch eine Verwendung in der Rekonstruktion der kornealen Oberfläche bei der Behandlung von Patienten mit Schäden in der limbalen Stammzellenpopulation. Bei partiellen oder fokalen Limbusstammzellinsuffizienzen ist die Transplantation von Amnionmembran häufig ausreichend, jedoch versagt diese Methode bei ausgeprägten Limbusstammzellinsuffizienzen.

Eine modifizierte Methode stellt die Transplantation von kultivierten kornealen Epithelzellen auf dem Träger Amnionmembran dar. Epithelzellen werden von einem Spenderauge isoliert und auf Amnionmembran unter Kulturbedingungen direkt transplantiert. Es folgt eine Kultivierung der Epithelzellen auf dem Amnion. Anschließend

wird die Aufbringung und Aufnähung der Membran auf das Patientenauge durchgeführt. Es zeigen sich Ergebnisse, die selbst bei größeren Limbusinsuffizienzen zufriedenstellend waren. Diese Methode setzt die Verfügbarkeit von Epithelzellkulturen voraus. Eine mögliche Quelle zur Etablierung dieser Kulturen könnten Spenderhornhäute darstellen. Koizumi et al. (2000) untersuchten die Kultivierung von kornealen Epithelzellen auf intakten und auf von der eigenen Epithelschicht gereinigten Amnionmembranen. Auf den gereinigten Membranen zeigten sich größere Flächen von kornealen Epithelzellen. Dieselbe Arbeitsgruppe verglich 2000 die Kultivierung von mit limbalen kornealen Epithelzellensuspensionen auf gereinigten Amnionmembranen mit der Kultivierung von humanen limbalen kornealen Epithelzellen durch Gewebestücke aus der limbalen Region auf gereinigten Amnionmembranen. Es zeigten sich bei den Kulturen mit der Epithelzellsuspension ein engerer Zell- Zell- Kontakt sowie eine höhere Anzahl an Desmosomen. Rama et al. (2001) untersuchten die Wirkung von Epithelzellen auf Fibrinstreifen als Transplantat bei Patienten mit einseitigem Limbusstammzelldefizit. Bei 14 von 18 Patienten zeigten sich im Langzeit-Follow-Up eine deutliche Verbesserung des klinischen Befundes sowie eine Visusverbesserung von Lichtschein und Fingerzählen auf bis zu Visusstufen von 0,8-1,0. Grueterich et al. (Archives of Ophthalmology, 2002) untersuchten die Eigenschaften von humanen limbalen kornealen Epithelzellen auf intakten Amnionmembranen. Aus der reduzierten Menge an dem Keratin 3 und dem Protein Connexin 43, beobachtet durch die Arbeitsgruppe mittels immunzytochemischen Färbungen, sowie einer reduzierten Proliferationsaktivität, gemessen durch den Einbau von Bromodeoxyuridin, schlossen sie auf ein geringeren Differenzierungsgrad und ein langsames Wachstum, was mit Stammzeleigenschaften einhergeht. Nakamura et al. (2003) berichteten in einer Fallbeschreibung von drei Patienten, die nach einem Limbusstammzelldefizit mit gereinigten und limbalen kornealen Epithelzellen angereicherten Amnionmembranen versorgt wurden. Die Zellen wurden hierbei von

frischen Spenderaugen gewonnen. Es zeigten sich 48 Stunden nach dem Eingriff eine glatte, klare Hornhaut und eine vollständige Reepithelialisierung der Hornhaut.

5. Zelllabor

Als Quelle zur Etablierung humaner kornealer Epithelzellkulturen können Spenderhornhäute dienen. Im Gegensatz zum amerikanischen Kontinent herrscht in Europa die Langzeitorgankultivierung vor, bei der die Hornhaut mitsamt eines Skleralringes kultiviert wird. Das heißt, dass diese Präparate auch die als Sitz der Epithelstammzellen vermutete Limbusregion enthalten. Zudem können als Quelle auch Skleralringe, die nach einer Hornhauttransplantation zurückgeblieben sind, dienen. Sie beherbergen dann noch die Limbusregion des Epithels.

Die Methode der Langzeitkultivierung sieht vor, dass die Hornhaut möglichst schnell nach dem Tod des Spenders präpariert wird. Anschließend erfolgt eine Bestimmung der Endothelzellzahldichte, die nicht unter 2000 Zellen/ mm² liegen sollte. Soweit genügend Endothelzellen vorhanden sind wird die Hornhaut unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Bei Bedarf, z.B. für eine bevorstehende Keratoplastik, wird die Hornhaut entquollen und die Endothelzellzahl erneut bestimmt. Ist der Zellverlust (500 Zellen/ mm²) nicht zu groß, kann die Hornhaut für die Operation freigegeben werden. Vorteile dieser Methode liegen, im Gegensatz zur sofortigen Transplantation nach Gewinnung des Spendermaterials, in der Planbarkeit von Operationen, im Vorliegen von Transplantaten bei Notfallkeratoplastiken sowie in Beobachtungen der Endothelzellldichte über einen längeren Zeitraum und damit in einer größeren Überlebenschance des Transplantates. Auf dem europäischen Kontinent sind heutzutage ca. 40% des gewonnenen Spendermaterials nach Langzeitkultivierung für eine Keratoplastik geeignet.

Der Vorteil einer Kultivierung von limbalen kornealen Epithelzellen über einen längeren Zeitraum liegt im Gewinn einer erhöhten Anzahl von Zellen. Ein Auftragen von mehr Epithelzellen auf Amnionmembran anstatt eines Auftragens von wenigen, frisch isolierten Epithelzellen verspricht eine dichtere Bewachung der Membran mit kornealen Zellen.

Die Charakterisierung der Zellen wird unter anderem über den immunzytochemischen Nachweis von den Matrixproteinen des kornealen Epithels vorgenommen. Korneale Epithelzellen zeichnen sich durch ihre regelmäßige, polygonale Form aus und bilden für gewöhnlich in Zellkulturen einen Monolayer. Auf der Pre-ARVO 2000, einer wissenschaftlichen Reviewveranstaltung im Zuge des jährlichen Kongresses der ARVO, wurde ein Expressionsmuster der Matrixproteine des Hornhautepithels vorgestellt. Besonders das Tenascin C wird sehr häufig zur Unterscheidung des Hornhautepithels aus dem Zentrum und dem aus Limbusregion herangezogen (z.B. Maseruka et. Al; 1997). Es wurde festgestellt, dass in den zentralen Regionen der Hornhaut das Epithel das Matrixproteins Kollagen Typ IV bildet. Hier sind jedoch die Matrixproteine Laminin und Tenascin C nicht zu finden. In der limbalen Region wurden die Matrixproteine Laminin und Tenascin C gefunden, jedoch war kein Nachweis des Matrixproteins Kollagen Typ IV möglich. Mit diesen Markern lassen sich korneale Epithelzellen aus dem Zentrum und der Limbusregion der Hornhaut aufgrund ihres Matrixexpressionsmusters unterscheiden. Wichtig ist auch eine Abgrenzung des kornealen Epithels von dem konjunktivalem Epithel. Kultivierte limbale, korneale Epithelzellen unterscheiden sich von konjunktivalen Epithelzellen neben morphologischen Gegebenheiten durch das Fehlen von muscinproduzierenden Zellen (unter anderem Diebold et. Al; 1997 May).

	Limbale, epitheliale, basale Zellen	Zentrale basale Zellen
Tenascin C	XXX	
Alpha,2,3 Sialylation		XXX
Kollagen Typ 4		XXX
Connexin 43,50		XXX
ICDH		XXX
Enolase	XXX	
K3		XXX
Laminin (Alpha2, Beta3)	XXX	

Tabelle 1: Matrixproteine der kornealen Epithelzellen; limbale und zentrale Region im Vergleich

6. Ziel

Das intakte Epithel der Hornhaut ist eine wichtige Voraussetzung für die Transparenz der Kornea und damit des Sehens. Verschiedenste Erkrankungen können zu Störungen der Epithelregeneration führen. Besonders das Limbusstammzelldefizit ist eine schwerwiegende Erkrankung, die die Regenerationsfähigkeit des Epithels stark einschränkt. Sie geht mit Konjunktivierung, Vaskularisierung und Vernarbung der Hornhaut einher. Verschiedene Therapieformen, wie z.B. die Limbusstammzelltransplantation, führen entweder zu nicht zufriedenstellenden Ergebnissen oder sind in Ihrer Durchführung durch Verfügbarkeit von Spendermaterial limitiert. Durch eine neue Methode Epithelzellen auf Amnionmembran zu züchten und

dann auf das geschädigte Auge aufzutragen, gibt es eine neue Möglichkeit, das Limbusstammzelldefizit zu therapieren.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine neue Isolations- und Kultivierungsmethode für humane korneale Epithelzellen zu etablieren. Diese Kulturen sollten, im Gegensatz zu vorherigen Isolationsmethoden von limbalen kornealen Epithelzellen, von organkultivierten Spenderhornhäuten oder von Skleralringen nach einer Hornhauttransplantation gewonnen werden. Es bietet sich dann auch an, durch Kryokonservierung ein Pool an Epithelzellen anzulegen, auf den sich dann bei Bedarf zugreifen lässt. Durch eine Kryokonservierung ist eine bessere Planbarkeit vor operativen Eingriffen gegeben und es ergibt sich die Möglichkeit eines Vergleichs der HLA-Typisierung und eines Abgleichs von HLA-Mustern zwischen Spender und möglichem Empfänger.

Voraussetzung für den täglichen therapeutischen Einsatz an Patienten von limbalen kornealen Epithelzellen und Ziel dieser Arbeit ist zudem eine Charakterisierung dieser Zellen. Die Entwicklung einer Kulturmethode und die Vermehrung der Zellen sind für dieses Vorhaben erforderlich.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Medium F12 Ham	(Invitrogen)
Medium Dulbecco` s Mod Eagle	(Invitrogen)
FCS	(Invitrogen)
Insulin	(Sigma)
Choleratoxin	(Sigma)
Transferrin	(Sigma)
Triiodo-L-Thyronin	(Sigma)
Adenin	(Sigma)
Hydrocortison	(Sigma)
Glutamin	(Biochrom)
Epidermal Growth Factor	(Biochrom)
Gentamicin	(Invitrogen)
Amphoterecin B	(Biochrom)
Mausimmunoglobuline	(DAKO)
Kanninchenimmunoglobuline	(DAKO)
Rabbit-AK gegen humanes Laminin	(DAKO)
Muriner AK gegen humanes Kollagen IV(100mg/l)	(DAKO)
Muriner AK gegen humanes Tenascin C(15mM)	(Novo)
5-Brom-2` -desoxy Uridin (BrdU)	(Roche)
Muriner AK gegen humaes BrdU	(Roche)

PBS ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺	(Biochrom)
PBS mit Mg ²⁺ und Ca ²⁺	(Biochrom)
Trypsin/EDTA	(Invitrogen)
Dimethyl Sulfoxide	(Sigma)
LSAB- System	(Dako)

1.2 Geräte

Werkbank	(Herqaeus Instruments)
Phasenkontrastlichtmikroskop	(Olympus)
Inkubator	(Herqaeus Instruments)
Trepan 9mm Durchmesser	(Pharmacia)
Kolibripinzette	(Geuder)
Hockeymesser	(Geuder)
24-Lochschale	(Costar)
12-Lochschale	(Costar)
6-Lochschale	(Costar)
25cm ² -Kulturflasche	(Costar)
Chamber Slide	(LAB-TEK)
Neubauerkammer	
Eppendorfpipetten	(Eppendorf)
Einwegpipetten	(Falcon)
Falconröhrchen	(Falcon)
Disposable Conical Tubes	(Nunc)
1 ml Einwegspritze	(Braun)
0,9 mm-Durchmesser-Nadel	(Braun)

Mikroporenfilter	(Milex)
kleiner Mikroporenfilter	(Milex)
Cryo Vial	(Greiner)

1.3 Material zur Gewinnung von humanen kornealen Epithelzellen

Es wurden humane Spenderhornhäute, die wegen einer zu geringen Endothelzahldichte nicht für eine Hornhauttransplantation geeignet waren, sowie Skleralringe von humanen Spenderhornhäuten nach Hornhauttransplantation als Material zur Gewinnung humanen kornealen Epithelzellen verwendet.

2.Methoden

2.1 Medium zur Kultivierung von humanen kornealen Epithelzellen

Als Medium wurde, wie von Pellegrini et al vorbeschrieben, eine 4:1 Mischung aus den Medien Dulbecco`s Mod. Eagle und Ham`s F12 hergestellt und anschließend mit 10 % FCS, Insulin (5 mg/l), Cholera Toxin (0,1 µg/ml), Transferrin (5 mg/l), Triiodithyronin (2 nmol/l), Adenin (18 mmol/l), Hydrocortison (0,4 mg/l), Glutamin (4 mmol/l), Epidermal Growth Factor (10 ng/ml), Gentamicin (0,5 ml/100ml Medium) und Amphoterecin B (1ml /100 ml Medium) supplementiert. Das Medium wurde bis maximal 14 Tage nach Herstellung verwendet.

2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen kornealen Epithelzellen

Spenderhornhäute, die nicht für eine Hornhauttransplantation geeignet waren, sowie Skleralringe von Spenderhornhäuten nach Hornhauttransplantation wurden einzeln in eine 24-Lochschale mit 0,5 ml Medium gelegt. Von diesen Hornhäuten bzw. von diesen Skleralringen wurden Epithelzellen gewonnen, indem mittels eines Hockey-Messers eine Abrasio in der Limbusregion durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Hornhaut bzw. der Skleralring aus der 24-Lochschale entfernt. Bei einigen Hornhäuten erfolgte vor der Epithelgewinnung eine Trepanation mit einem 9 mm-Durchmesser-Trepan. Die beiden Teile der Hornhaut wurden in verschiedene Löcher einer 24-Lochschale gelegt. Die Gewinnung der Epithelzellen erfolgte von beiden Teilen der Hornhaut separat nach dem oben beschriebenen Verfahren. Die 24-Lochschale mit dem frisch gewonnenen kornealen Material wurde in einem Brutschrank bei 37°C und unter 5 % CO² über Nacht gelagert. Am folgenden Tag erfolgten eine lichtmikroskopische Befundung sowie der Wechsel des Mediums. Die ersten sieben Tage wurden die Epithelzellen lichtmikroskopisch beobachtet. Solange sich noch keine Zellgruppen auf dem Boden der Kulturschale angeheftet hatten, wurde das Medium nicht gewechselt. Danach erfolgte alle zwei bis drei Tage ein Wechsel des Mediums.

2.3 Umsetzen von humanen, kornealen Epithelzellen

Sobald sich ein Monolayer gebildet hatte, erfolgte eine Umsetzung der Zellen auf eine 12-Lochschale. Die Kultur wurde zwei bis drei mal mit 0,5 ml PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ gewaschen und anschließend wurden 0,1 ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02%) zur Kultur hinzugegeben. Das Trypsin wurde unter Schwenken über die gesamte Fläche verteilt und der Überstand abgesaugt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde die 24-Lochplatte mit 0,5 ml

PBS ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} gespült. Unter dem Lichtmikroskop wurde unter Sicht ein wenig an der Platte gerüttelt, so dass sich die Zellen vom Boden lösten. Anschließend wurde die Zellsuspension mit einer Pipette aufgenommen und zusammen mit 3 ml Medium in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben. Wenn sich nach lichtmikroskopischer Untersuchung noch Zellen in der Schale befanden, wurde der die Zellen ablösende Vorgang bis zu drei mal wiederholt. Die Zellsuspension wurde bei einer Beschleunigung von 100 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde mit 1 ml Medium aufgenommen und in ein Loch einer 12-Lochschale gegeben. Nachdem sich ein erneuter Monolayer gebildet hatte, erfolgte nach der gerade beschriebenen Methode eine Umsetzung auf eine 6-Lochschale und im weiteren auf eine 25 cm²- Kulturflasche.

2.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

Die Neubauerzählkammer wurde vor der Benutzung von Staub befreit und gegebenenfalls getrocknet. Anschließend erfolgte die Anheftung eines geschliffenen Deckglases, wobei sich die typischen Newton'schen Ringe bildeten, ein Zeichen für das richtige Aufsetzen des Deckglases. An den offenen Enden wurde zwischen dem Deckglas und der Neubauerkammer jeweils ein Tropfen der Zellsuspension aufgetragen, so dass sich durch die Kapillarwirkung ein schmaler Film mit der Suspension unter dem Deckglas bildete. Anschließend erfolgte eine Auszählung der Zellen in den 8 Rechtecken mit jeweils 16 Feldern. Es wurde der Mittelwert der Anzahl der Zellen pro Rechteck und die entsprechende Standardabweichung ermittelt. Aus dem Mittelwert ergab sich die Zellkonzentration nach folgender Beziehung: Mittelwert der Zellen * 10^4 = Zellen pro ml Zellsuspension.

2.5 Immunzytochemische Färbungen

Bei einer immunzytochemischen Färbung wird zwischen einem direkten und einem indirekten Nachweis unterschieden. Bei dem direkten Nachweis wird ein enzymgekoppelter spezifischer Antikörper eingesetzt, der mit einem bestimmten Gewebsantigen reagiert. Bei der indirekten Technik bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen. Ein enzymmarkierter Antikörper oder ein fluoreszenzmarkierter Antikörper, der gegen den konstanten Anteil des Primärantikörper gerichtet ist, reagiert mit dem Primärantikörper. Während der variable Anteil des Antikörpers das Antigen erkennt, stellt der konstante Anteil des Antikörpers den Nachweis sicher. In diesen Untersuchungen wurden ausschließlich indirekte Färbemethoden angewandt. Zellen wurden nach der in 2.3 beschriebenen Methode auf Chamber Slides ausgesät. Zum Nachweis von Proliferation durch Marker wurden nicht konfluente und konfluente Zellkulturen verwendet, während zur Anfärbung von Matrixproteinen nur konfluente Platten benutzt wurden. Das Medium wurde dekantiert und die Platten zwei bis drei mal mit PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} gewaschen. Anschließend wurden 50 μ m Glycinpuffer (50 mmol; pH 2,7; 70 % Ethanol) auf die Platten gegeben. Die Zellen wurden für 10 bis 30 min bei -20° C fixiert. Anschließend wurden die Platten mit einer 1%igen FCS-Lösung (in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) 2-3 Mal gespült. Der erste Antikörper (1:10) wurde in einer 10%igen FCS-Lösung in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} 1:100 verdünnt und auf die Platten gegeben. Als Negativkontrolle wurde in einem Loch der Chambers Slides nur eine 10 %ige FCS-Lösung in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde. Dann wurden die Platten mit der 1%igen FCS-Lösung zwei bis dreimal gespült. Eine zweite Antikörpersuspension (1:10) mit einem durch Fluoreszenzlicht anregbaren Anteil wurde in einer 10%igen FCS-Lösung (aufgelöst in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} 1:100 verdünnt und auf die Platte

gegeben. Als Negativkontrolle wurde in eine Kammer der Chambers Slides, das mit dem ersten Antikörper inkubiert wurde, nur 10 %ige FCS-Lösung (aufgelöst in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) hinzugegeben. Die Inkubationszeit betrug 0,5 bis 1 Stunde. Danach wurden die Platten erneut mit einer 1%igen FCS Lösung (aufgelöst in PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+}) 2-3 Mal gespült. Die letzte Spüllösung wurde nicht abgekippt. Im Anschluss wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop der fluoreszierende zweite Antikörper angeregt und sichtbar gemacht. Anschließend erfolgte eine Fotodokumentation der Ergebnisse mit einer an ein Phasenlichtmikroskop angeschlossenen digitalen Fotokamera.

2.6 Fuchsinfärbung mit einem LSAB-System der Firma DAKO

Alternativ zu der oben genannten Färbemethode wurde die Labelled- Streptavidin- Biotin-Methode (LSAB- Methode), in diesen Versuchen ein vorgefertigtes LSAB-System der Firma DAKO, zur Anfärbung von Antikörpern gegen den Proliferationsmarkern BrdU benutzt. Biotinylierte Brückenantikörper reagieren mit Streptavidinmolekülen, die mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettichperoxidase konjugieren. Nach der einstündigen Inkubation mit dem ersten Antikörper gegen BrdU wurde die Platte 2 bis 3 Mal mit PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} (jedoch ohne FCS) gewaschen. Nach dem Abkippen des PBS wurden in jedes Loch der Chambers Slide zwei Tropfen Link des LSAB- Systems für 10 bis maximal 30 min gegeben. Nach erneuter 2 bis 3-facher Spülung mit PBS mit Mg^{2+} und Ca^{2+} wurden jeweils 2 Tropfen Streptavidin-AP pro Loch der Platte für 10 bis maximal 30 min hinzu gegeben. Für den nächsten Schritt wurde eine Mischung aus 3 Tropfen Fuchsin Activating Agent und 3 Tropfen Fuchsin Chromogen gebildet und auf 2 ml mit Fuchsin Buffered Substrate aufgefüllt. Nach einer Spülung mit destilliertem Wasser erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatotoxin. Die zu untersuchenden Strukturen färbten sich rötlich an.

2.7 Proliferationstest mit Bromdesoxyuridin

Zur Untersuchung einer Proliferationsaktivität erfolgte eine Fütterung der Zellen mit dem oben beschriebenen Medium (Abschnitt 2.1) mit einer zusätzlichen Gabe von 10 mM 5-Brom-2'-desoxy-Uridin (BrdU) für 18-30 Stunden. Bei einer Proliferationsaktivität erfolgte ein Einbau dieser Base in die neu synthetisierte DNS des Zellkerns. Nach dem Fixierschritt mit Glycinpuffer (50 mmol; pH 2,7; 70 % Ethanol) erfolgte eine Inkubation mit 2 N HCl-Lösung für 1 h bei 37° C und ein anschließendes, dreimaliges Waschen mit Borate-Puffer (10 mM). Hierbei wurde der Puffer für jeweils 5 min auf den Zellen belassen. Die oben beschriebene immunzytochemische Färbung (Abschnitt 2.6) zeigte den Einbau von BrdU in den Zellkern an. Wurde BrdU in die Zellkerne eingebaut, waren die Zellkerne rot angefärbt, ansonsten waren die Zellkerne nicht rot angefärbt.

2.8 Quantitative Untersuchung der Zellproliferation und Erstellung einer Wachstumskurve

Nach Gewinnung und Kultivierung der Epithelzellen nach oben beschriebener Methode (Abschnitt 2.2) bildete sich innerhalb von ein bis zwei Wochen ein Monolayer in der 24-Lochschale. Es erfolgte eine Umsetzung der Zellen auf eine 12-Lochschale und eine vorhergehende Zählung der Zellen mit der Neubauzählkammer. Nachdem sich ein vollständiger Monolayer gebildet hatte, erfolgte ein Umsetzen der Zellen auf eine 6-Loch Schale. Bei weiteren Umsetzungen erfolgte eine Aussaat der Zellen auf eine 25-cm²-Zellkulturflasche mit vorhergehender quantitativer Bestimmung der Zellen. Dann wurden im Wochen-Rhythmus die Zellen trypsiniert, gezählt und eine Anzahl an 80000 Zellen pro Flasche ausgesät. Das Wachstumsverhalten wurde anhand der kumulativen Populationsverdoppelung (CPD) beschrieben. Die kumulative Populationsverdoppelung

gibt die Addition der Populationsverdoppelungen (PD) bei dem jeweiligen Umsetzen der Zellen an: $CPD = \sum PD$ ($n =$ Anzahl der Passagen). Die Populationsverdoppelung errechnet sich aus: $PD = [\ln(\text{Zellzahl am Ende der Wachstumperiode}) - \ln(\text{Zellzahl am Anfang der Wachstumperiode})] / \ln 2$. Bei fünf Hornhäuten wurde die kumulative Populationsverdoppelung pro Passage bestimmt. Anschließend wurde der Mittelwert und die Standardabweichung der kumulative Populationsverdoppelung pro Passage bestimmt.

2.9 Kryokonservierung von humanen korneale Epithelzellen in flüssigem Stickstoff bei -196°C

Nachdem sich ein Monolayer in einer 25 cm^2 -Flasche gebildet hatte, wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Medium addiert mit einem Zusatz von 10 % Dimethyl Sulfoxide aufgenommen, in ein Cryo Vial gegeben, in eine Abkühlbox gepackt und mit 10°C pro Stunde auf -80°C in einer Gefriertruhe abgekühlt. Anschließend erfolgte die Kryokonservierung in einem Stickstoffbehälter bei -196°C . Die Aufbewahrung der Zellen ist über einen Zeitraum von mehreren Jahren möglich. Das Auftauen der Zellen erfolgte über ein rasches Erwärmen und der Aussaat der Zellsuspension in eine 25 cm^2 -Flasche mit zusätzlicher Gabe von 3 ml Medium. Anschließend heftete eine große Anzahl der Zellen auf dem Plastikboden der Flasche an. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch 5 ml reines Epithelmedium ausgewechselt. Die Zellen vermehrten sich wieder, bis sich ein Monolayer bildete.

IV. Ergebnisse

1. Lichtmikroskopische Untersuchungen

Bei 13 von 23 Hornhäuten und 8 von 16 Skleralringen wurden Epithelzellen erfolgreich gewonnen. Der Mittelwert des Alter der Spender, bei denen erfolgreich Zellen isoliert und kultiviert wurden, ist mit 44,54 Jahre und mit einer Standardabweichung von 10,41 Jahren im Gegensatz zu dem Alter der Spender, von denen keine Zellen kultivieren werden konnten, mit einem Mittelwert von 68,83 Jahren und einer Standardabweichung von 6,45 Jahren geringer. Das Spenderalter von Skleraringen, von denen Zellen gewonnen werden konnten, liegt bei einem Mittelwert von 48,88 Jahren mit einer Standardabweichung von 15,31 Jahren im Gegensatz zu den Spenderalter von Skleraringen, von denen keine Zellen gewonnen werden konnten, bei einem Mittelwert von 59,88 Jahren und einer Standardabweichung von 13,15 Jahren. Die Post- Mortem- Zeit ist die Zeitspanne vom Todeszeitpunktes des Spenders bis zur Organkultivierung der Spenderhornhaut im Kulturschrank. Der Mittelwert der Post- Mortem- Zeit liegt bei den zellgewinnenden Hornhäuten bei 22,92 Stunden mit einer Standardabweichung von 6,45 Stunden unter dem Mittelwert der Post- Mortem- Zeit der nicht zu zellgewinnenden Hornhäuten mit einem Mittelwert von 34,18 Stunden und einer Standardabweichung von 11,62 Stunden. Der Mittelwert der Post- Mortem- Zeit liegt bei den zellgewinnenden Skleraringen bei 20,13 Stunden mit einer Standardabweichung von 7,30 Stunden unter dem Mittelwert der Post- Mortem- Zeit der nicht zellgewinnenden Skleraringen mit einem Mittelwert von 26,88 Stunden und einer Standardabweichung von 5,00 Stunden.

Nach Isolation der Zellen mittels Abrasio in der Limbusregion bildeten sich in der 24-Lochschale kleine Zellgruppierungen von 10 bis 20 Zellen, die an dem Plastikboden anhefteten. Innerhalb von wenigen Tagen bildeten sich erste Zellausläufer (Abb. 4.1) und

es waren bei der mikroskopischen Untersuchung eine deutliche Vermehrung der Zellen zu sehen. Innerhalb einer Woche bildeten die Zellen einen Monolayer. Zellen mit polygonalem Aussehen bildeten einen geschlossenen Monolayer.



Abbildung 4.1: Humane limbale korneale Epithelzellen in der Primärkultur. Die phasenkontrastmikroskopische Aufnahme zeigt eine Kultur drei Tage nach Isolation der Zellen. Die Zellen heften sich am Boden der 24-Lochschale an. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

Um die Zellproliferation von peripheren und zentralen Epithelzellen zu vergleichen, wurden bei fünf Hornhäuten die zentralen Anteile mit einem 9 mm Trepan herausgeschnitten. Die Isolierung der Zellen erfolgte, wie beschrieben, von dem zentralen und dem peripheren Anteil der Hornhäute. Während Zellwachstum, wie oben beschrieben, mit den peripheren Zellen erreicht wurde, zeigten die vom Zentrum isolierten Epithelzellen keine Proliferation. Es waren nach der Abrasio einzelne Zellgruppen, die sich nicht an der Kulturschale anhefteten und sich dem entsprechend nicht vermehrten, zu sehen.



Abbildung 4.2: Humane limbale korneale Epithelzellen in der Primärkultur nach einer Woche. Die Zellen bildeten einen geschlossenen Monolayer und zeichneten sich durch eine gleichmäßige Form aus. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

Abb. 4.2 zeigt den Monolayer einer Primärkultur. Aus der zentralen Region konnten keine Zellen in Kultur gebracht werden. Nach 3 Passagen bildeten die Zellkulturen bei einer Zellaussaat von 80000 Zellen innerhalb einer Woche wieder einen geschlossenen Monolayer. Die Zellen zeichneten sich durch ein polygonales Aussehen aus und waren phasenkontrastmikroskopisch, zu sehen in Abb. 4.3, gegenüber den Monolayern in Primärkulturen morphologisch unverändert.



Abbildung 4.3: Humane limbale korneale Epithelzellen nach 3 Passagen und ca. vier Populationsverdoppelungen. Die Zellen bildeten weiterhin einen geschlossenen Monolayer und zeichneten sich durch eine gleichmäßige polygonale Form aus. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 200 μm)

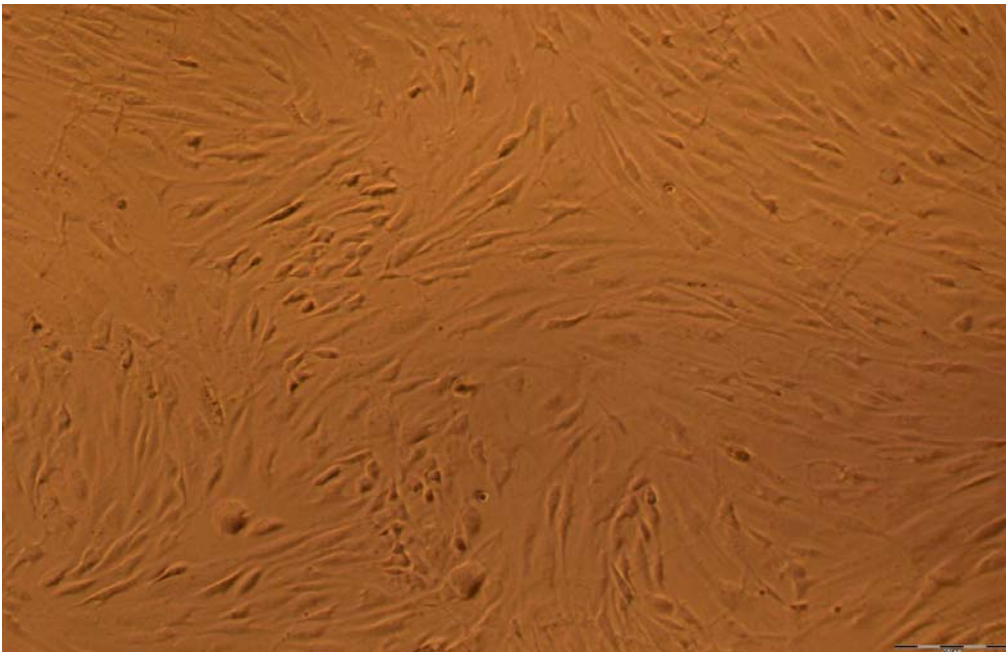


Abbildung 4.4: Humane limbale korneale Epithelzellen nach 7 Passagen und ca. zwölf Populationsverdoppelungen. Die Zellen zeigten sich in einer länglichen Form und variierten stark in ihrem Aussehen. Es bildete sich jedoch weiterhin ein geschlossener Monolayer. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 200 μm)

Nach 7 Passagen bekamen die Zellen eine fibroblastoide Form. Es zeigte sich eine höhere Variabilität in ihrem Aussehen. Die Zellen bildeten weiterhin bei einer Zellaussaat von 80000 Zellen nach einer Woche einen geschlossenen Monolayer. Abb. 4.4 zeigt die Zellen der siebten Passage mit ihrer elongierten Form und ihrer Variation in der Morphologie.

Nach 9 Passagen zeigten sich seneszente Zellen, die sich durch ihr fibroblastisches Aussehen und ihrer starker Variation der Morphologie auswiesen. Es bildeten sich nur noch vereinzelt kleine Gruppen von bis zu ca. 50 Zellen. Ein Monolayer bildete sich nicht mehr. Seneszente Zellen mit Vakuolen sind in Abb. 4.5 zu sehen.



Abbildung 4.5: Humane limbale korneale Epithelzellen nach 9 Passagen. Die Zellen zeigten deutliche Zeichen der Seneszenz mit Zellvakuolen und deutlich elongierte Formen. Es bildet sich kein vollständiger Monolayer mehr, stattdessen sind noch vereinzelt Zellgruppen zu sehen. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 50 μm)

2. Quantitative Untersuchung des Proliferationsverhaltens der limbalen kornealen Epithelzellen

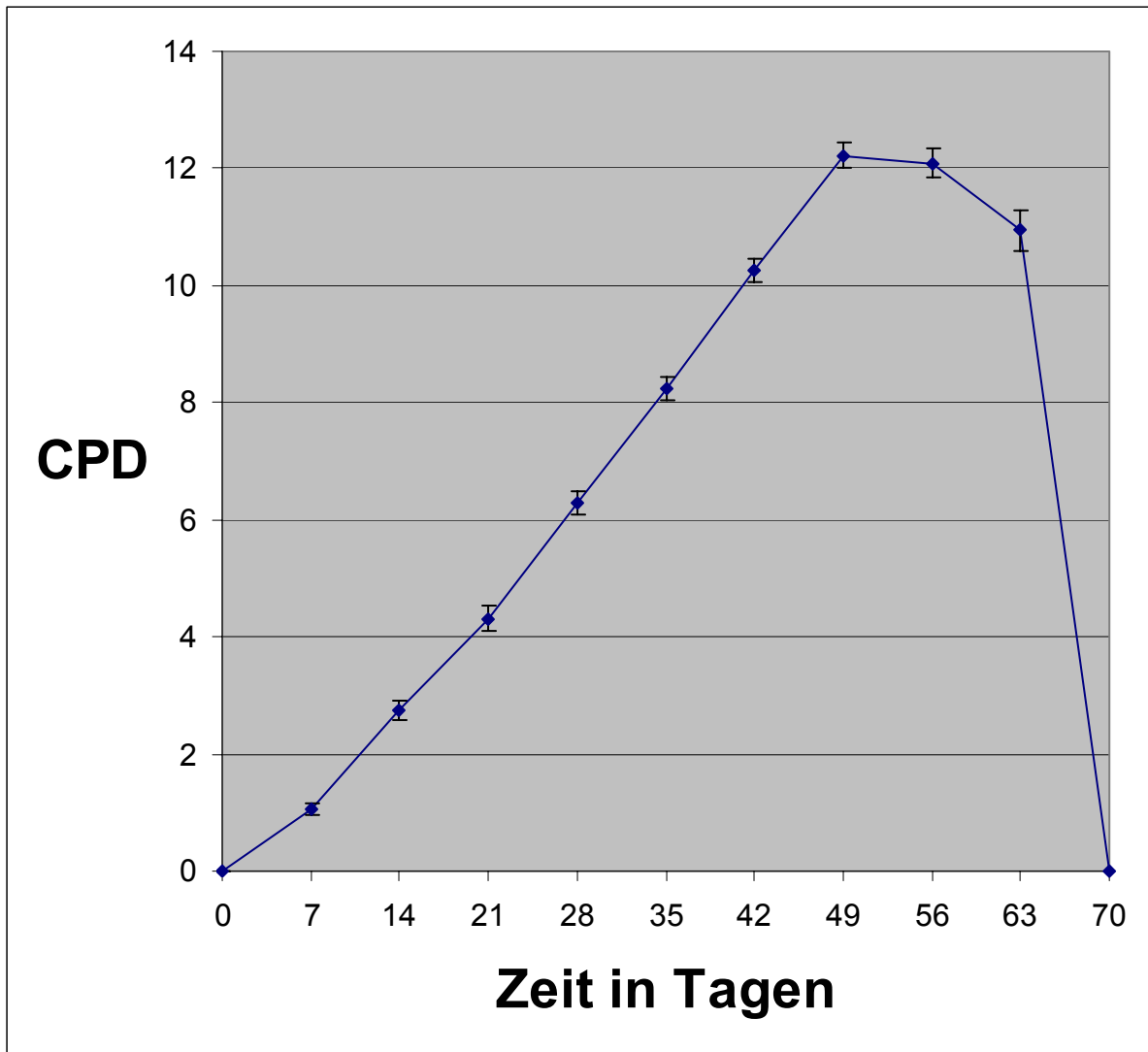


Abbildung 4.6: Kumulative Populationsverdoppelung (CPD) in Kulturen isolierter humaner kornealer Epithelzellen von 5 Hornhäuten. Bis zur achten Passage nahm die kumulative Populationsverdoppelung bis auf einen Wert von 12 zu. Ab der achten Passage nahm die kumulative Populationsverdoppelung rasch ab. Die Abnahme spiegelt das Absterben der Zellen wieder. Die schwarzen Markierungen über und unter eines jeden Punktes spiegeln die Standardabweichungen wieder.

In Abb. 4.6 ist das Wachstumsverhalten der limbalen kornealen Epithelzellen von fünf Hornhäuten dargestellt. Während der ersten 8 Passagen der Kultivierung steigt die Anzahl

der kumulativen Populationsverdoppelung auf 12 Populationsverdoppelungen an. Anschließend kam es zu einer rapiden Abnahme der Zellzahl, die sich in einer Abnahme der kumulativen Populationsverdoppelung zeigt. Die mittlere Generationszeit betrug 70 Tage.

3. Immunzytochemische Untersuchungen auf Matrixproteine der kornealen Epithelzellen

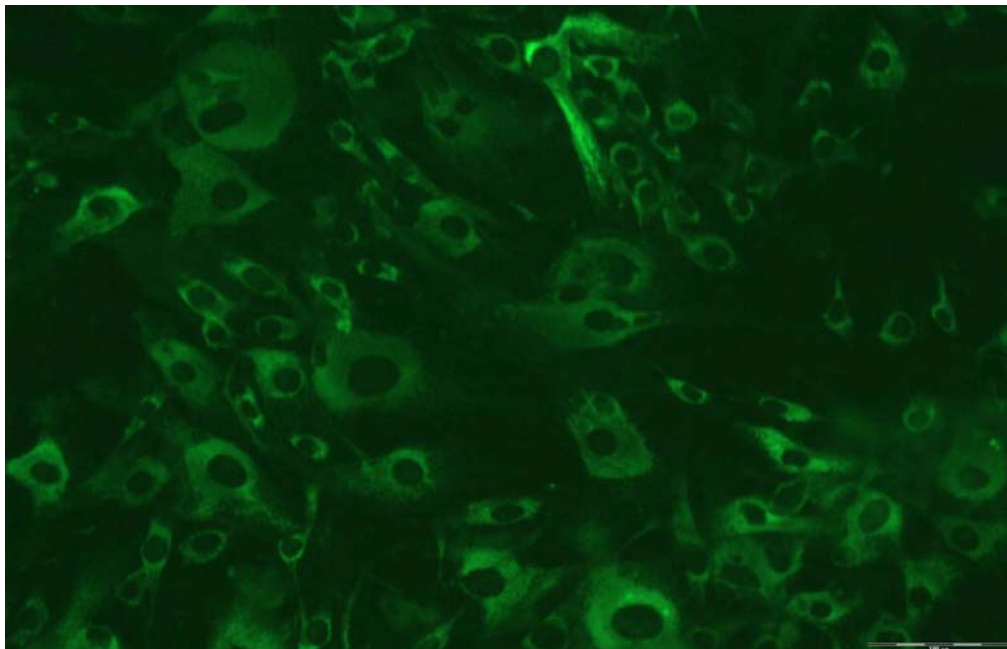


Abbildung 4.7: Die immunzytochemische Untersuchung auf das Matrixprotein Tenascin C zeigte eine positive Anfärbung von Epithelzellen der dritten Passage. Die Negativkontrollen zeigten keine Fluoreszenz. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

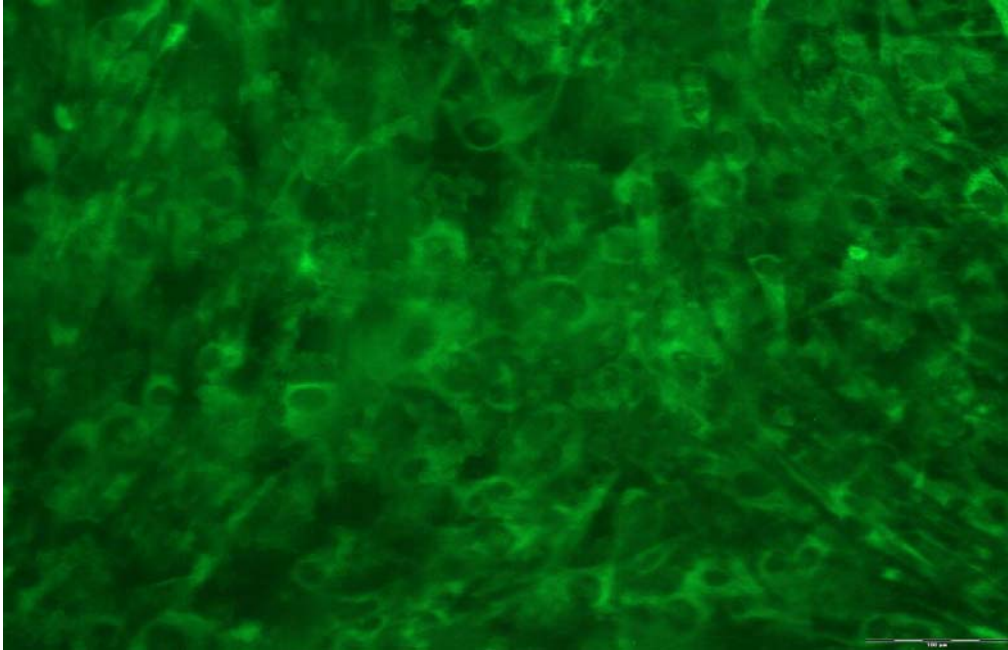


Abbildung 4.8: Die immunzytochemische Untersuchung auf das Matrixprotein Laminin zeigte eine positive Anfärbung von Epithelzellen der dritten Passage. Die Negativkontrollen zeigten keine Fluoreszenz. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

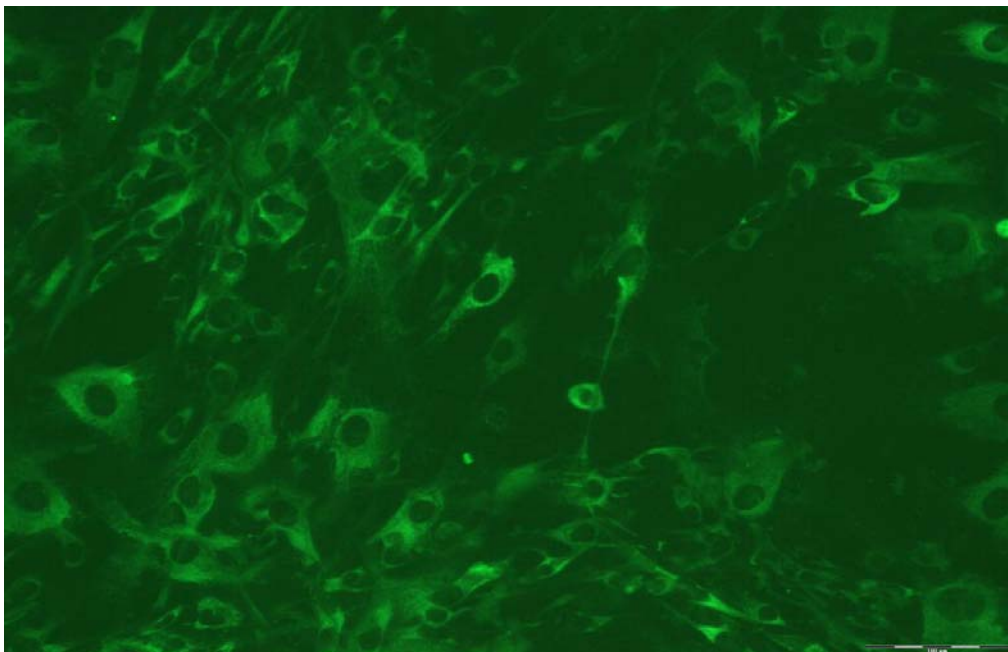


Abbildung 4.9: Die immunzytochemische Untersuchung auf das Matrixprotein Tenascin C zeigte eine positive Anfärbung von Epithelzellen der siebten Passage. Die Negativkontrollen zeigten keine Fluoreszenz. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

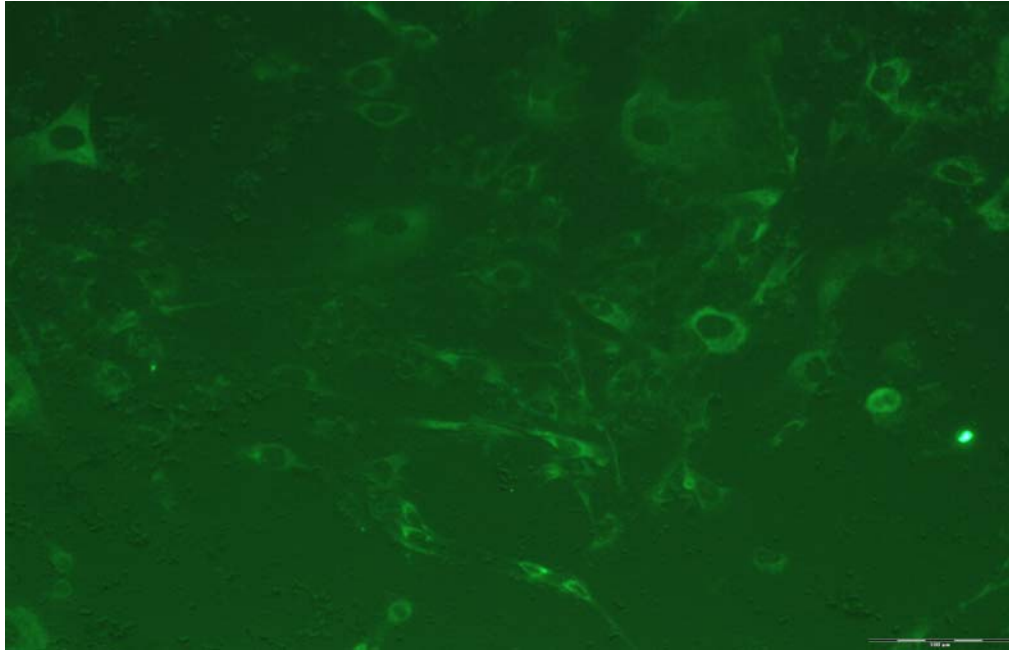


Abbildung 4.10: Die immunzytochemische Untersuchung auf das Matrixprotein Laminin zeigte eine positive Anfärbung von Epithelzellen der siebten Passage. Die Negativkontrollen zeigten keine Fluoreszenz. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

Eine immunzytochemische Untersuchung auf die Matrixproteine Laminin, Tenascin C und Kollagen Typ IV wurde mit Epithelzellen der dritten Passage vorgenommen. Die Matrixproteine Laminin und Tenascin C waren, wie in Abb. 4.7 und Abb. 4.8 zu sehen, nachweisbar und passen zum Expressionsmuster der limbalen kornealen Epithelzellen in vivo. Das Matrixprotein Kollagen Typ IV konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses entsprach ebenfalls dem Expressionsmuster der limbalen kornealen Epithelzellen in vivo. Abb. 4.9 und Abb. 4.10 zeigen die positiven Anfärbungen auf die Proteine Laminin und Tenascin. Die Kontrollfärbungen waren negativ.

Eine immunzytochemische Untersuchung auf die Matrixproteine Laminin, Tenascin C und Kollagen Typ IV wurde mit Epithelzellen der siebten Passage erneut vorgenommen. Die Matrixproteine Laminin und Tenascin C waren wieder nachweisbar. Das Matrixprotein Kollagen Typ IV konnte nicht nachgewiesen werden. Abb. 4.11 und Abb.

4.12 zeigen die positiven Anfärbungen auf die Proteine Laminin und Tenascin. Die Kontrollfärbungen waren negativ.

4. Proliferationstest mit Bromdesoxyuridin

In der dritten Passage wurden limbale korneale Epithelzellen auf Chamber Slides ausgesät. Bei nicht konfluenter Bewachung wurden diese Zellen nach oben beschriebener Methode mit BrdU gefüttert und eine immunozytochemische Untersuchung mit Fuchsin durchgeführt. Es zeigte sich bei der Anfärbung eine Vielzahl von BrdU-positiven Zellkernen. Abb. 4.11 a zeigt die positiven Anfärbungen auf die BrdU.

In der dritten Passage ergab nach konfluenter Aussaat und Fütterung mit BrdU eine immunzytochemische Untersuchung nach oben beschriebener Methode eine geringe Anzahl an gefärbten Zellkernen pro Fläche und eine große Anzahl an ungefärbten Zellkernen pro Fläche. Abb. 4.11 b zeigt bei wenigen Zellen eine positiven Anfärbungen auf die BrdU.

Nach 7 Passagen wurden erneut limbale korneale Epithelzellen auf Chamber Slides ausgesät. Bei nicht konfluenter Bewachung wurden diese Zellen nach oben beschriebener Methode mit BrdU gefüttert und ein immunzytochemische Untersuchung mit Fuchsin durchgeführt. Es zeigte sich bei der Anfärbung eine Vielzahl von BrdU-positiven Zellkernen pro Fläche. Abb. 4.12 a zeigt viele Zellkerne, in denen BrdU eingebaut wurde.

Nach 7 Passagen nach konfluenter Aussaat und Fütterung mit BrdU ergab eine immunzytochemische Untersuchung nach oben beschriebener Methode eine geringe Anzahl an gefärbten Zellkernen pro Fläche. Abb. 4.12 b zeigt nur wenige Zellkerne, in die BrdU eingebaut ist.

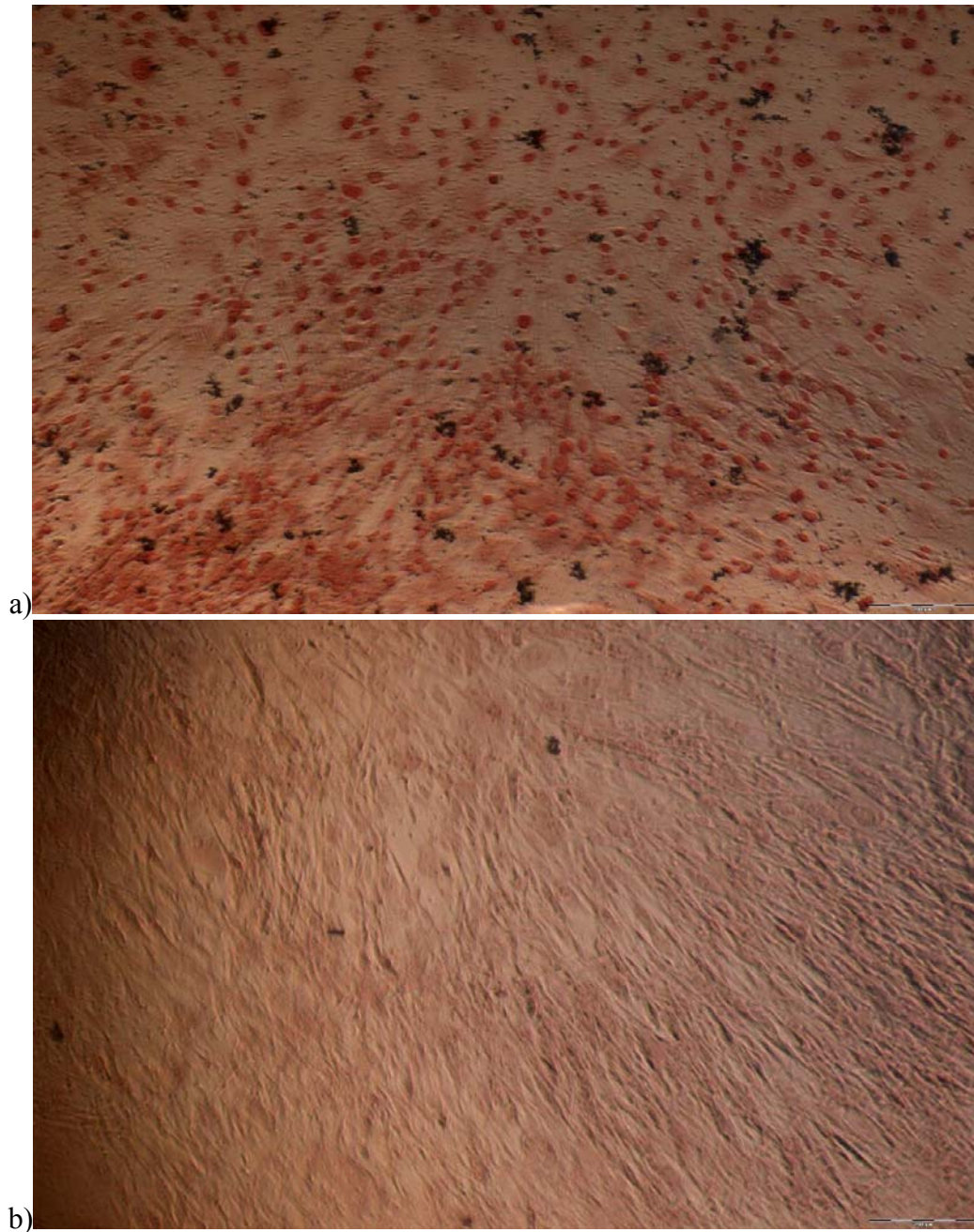


Abbildung 4.11: a) Es zeigte sich in nicht konfluenten Kulturen ein deutlicher Einbau von BrdU in den Zellkernen von Epithelzellen der dritten Passage. Der Antikörper gegen BrdU wurde mit einer Fuchsinfärbung rot angefärbt. Eine hohe Dichte an roten Zellkernen ist zu erkennen. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 200 µm)

b) Es zeigte sich in der konfluenten Kultur ein geringer Einbau von BrdU in den Zellkernen pro Fläche von Epithelzellen der dritten Passage. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 200 µm)

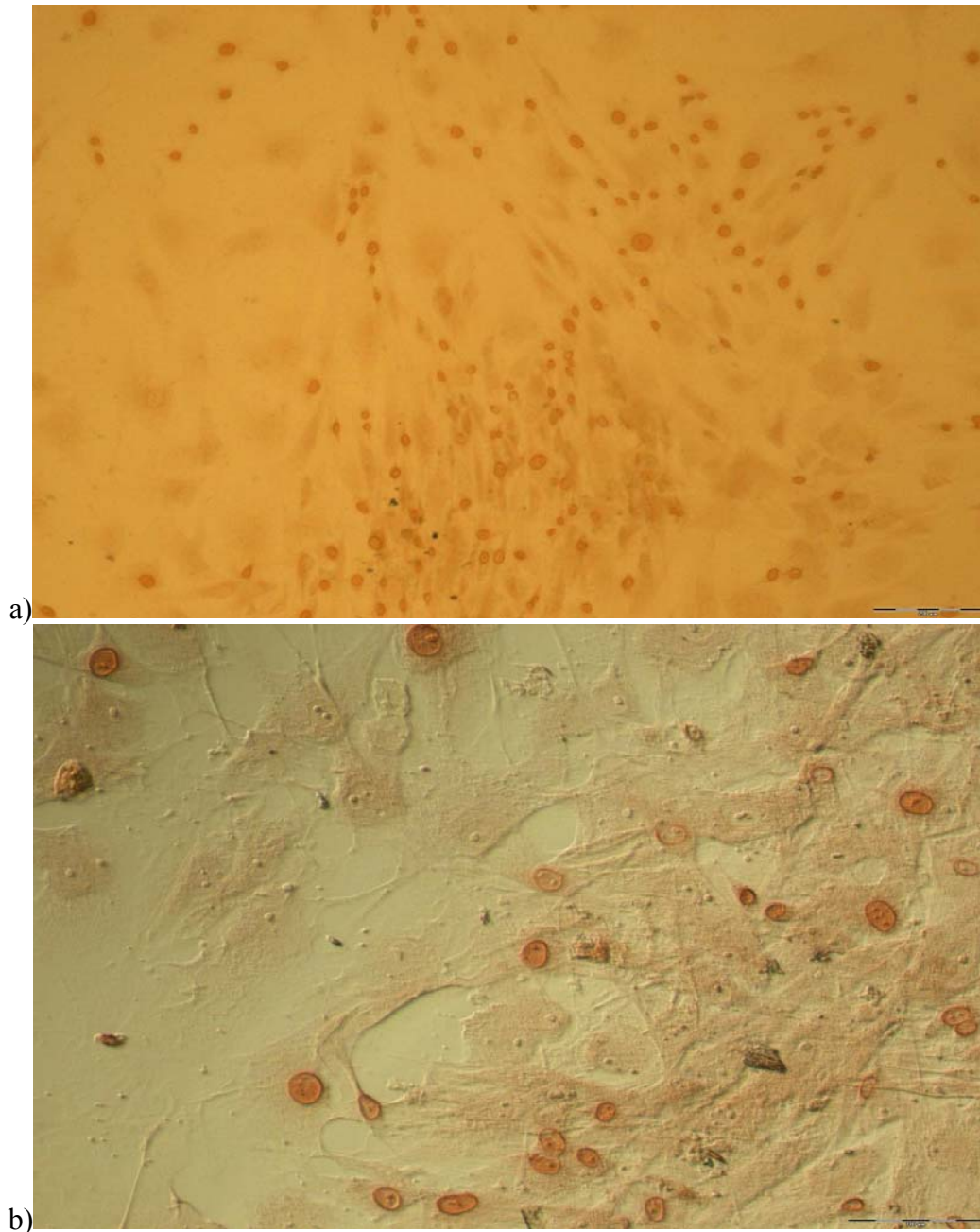


Abbildung 4.12: a) Es zeigte sich in nicht konfluenten Kulturen ein deutlicher Einbau von BrdU in den Zellkernen von Epithelzellen der siebten Passage. Der Antikörper gegen BrdU wurde mit einer Fuchsinfärbung rot angefärbt. Eine hohe Dichte an roten Zellkernen ist zu erkennen. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 200 μm)

b) Es zeigte sich in der konfluenten Kultur ein geringer Einbau von BrdU in den Zellkernen pro Fläche von Epithelzellen der siebten Passage. (Balkenlänge entspricht einer Länge von 100 μm)

V. Diskussion

Das Aufbringen von limbalen kornealen Epithelzellen auf Amnionmembran und eine nachfolgende Transplantation auf ein geschädigtes Auge ist eine neue Therapieform der Limbusstammzelleninsuffizienz. Kurzfristige Erfolge erreichte mit dieser Methode z.B. die Arbeitsgruppe Gueterich et Al. (Ophthalmology 2002). Es führte zu einer zeitlich begrenzten Verbesserung der Symptomatik und des subjektiven Empfindens des Patienten. Zudem wurde mittels immunzytochemischer Untersuchungen auf Matrixproteine festgestellt, dass das auf dem geschädigten Auge gebildete Epithel vom Proteinexpressionsmuster her dem kornealen Epithel entspricht.

Oft sind autologe Spenderzellen vom Patienten nicht zu gewinnen, da häufig beide Augen z.B. bei Verätzungen geschädigt sind. Zudem sind wie oben erwähnt die Therapieerfolge nur bedingt von längerer Dauer. Auch die Anzahl der Epithelzellen, die gewonnen werden können und auf Amnionmembran aufgebracht werden, ist sehr gering. Das Isolieren und Expandieren von Zellen, Auftragen auf Amnion und dann anschließendes Transplantieren ist eine Möglichkeit, diese Problematik zu umgehen. In dieser Arbeit wurden Epithelzellen von organkultivierten Spenderhornhäuten und Skleralringen gewonnen. Damit wurde eine Möglichkeit gefunden, diese Zellen von z.B. Überschussmaterial der Hornhauttransplantation zu gewinnen. Selbst Augenkliniken ohne eine Hornhautbank, aber mit Hornhauttransplantationen im Hause, wäre es nun theoretisch ermöglicht, limbale korneale Epithelzellen zu gewinnen und zu kultivieren.

Das Spenderalter der Hornhäute und Skleralringe, bei denen Zellen gewonnen werden konnten, lag mit 44,54 Jahren und 48,88 Jahren unter dem Alter bei den Hornhäuten (68,83 Jahren) und Skleralringen (59,88 Jahren), bei denen keine Zellen gewonnen werden konnten. Jedoch waren die Standardabweichungen so hoch und die Anzahl des Hornhautmaterials so gering, dass man von einem signifikanten Unterschied nicht

sprechen kann. In der Literatur sind bisher keine Untersuchungen bekannt, die den Rückschluss erlauben, dass limbale Epithelzellen eher von jungen Spendern zu gewinnen sind. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz, die dafür spricht, dass es erfolgreicher sein könnte, von jüngeren Spendern limbale Epithelzellen zu gewinnen. Es werden im weiteren Untersuchungen folgen müssen, um festzustellen, ob diese Tendenz sich bestätigt.

Die Post- Mortem- Zeit der Hornhäute und Skleralringe, bei denen Zellen gewonnen werden konnten, lag mit 20,13 Stunden und 22,92 Jahren unter der Post- Mortem- Zeit bei den Hornhäuten (34,18 Stunden) und Skleralringen (26,88 Stunden), bei denen keine Zellen gewonnen werden konnten. Jedoch waren die Standardabweichungen ebenfalls so hoch und die Anzahl des Hornhautmaterials so gering, dass man von einem signifikanten Unterschied auch hier nicht sprechen kann. In der Literatur sind keine Untersuchungen bekannt, die den Rückschluss erlauben, dass limbale Epithelzellen eher von Hornhäuten und Skleraringen mit geringer Post- Mortem- Zeit zu gewinnen sind. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz, die dafür spricht, dass es erfolgreicher sein könnte, von Spendermaterial mit kurzer Post- Mortem- Zeiten limbale Epithelzellen zu gewinnen. Es werden im weiteren Untersuchungen folgen müssen, um festzustellen, ob diese Tendenz sich bestätigt.

Sowohl in den Primärkulturen als auch in späteren Passagen bildeten die Epithelzellen einen gleichmäßigen Monolayer mit polygonalen Zellen. Nach drei Passagen organisierten sich die Zellen weiterhin zu einem homogenen Monolayer und behielten ihre typische Zellform bei. Nach sieben Passagen wurde nur noch ein ungleichmäßiger Monolayer gebildet. Die Zellen zeigten sich länglich. Nach 9 Passagen waren die Zellen nicht mehr in der Lage, einen Monolayer zu bilden. Es zeigten sich deutliche Anzeichen der Seneszenz der Zellen. Zellvakuolen waren häufig zu beobachten.

Wenige Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren humane Epithelzellen für Transplantationen in Kultur gebracht, ohne eine Membran oder Zellschicht als

Beschichtung für die Kulturschalen zu benutzen. Die Arbeitsgruppe Pellegrini et al. (1997) isolierte limbale korneale Epithelzellen, die sich in der Primärkultur schnell vermehrten und einen gleichmäßigen Monolayer aus polygonalen Zellen bildeten, um sie dann mittels Kontaktlinsen auf verätzte Augen aufzutragen. Die Arbeitsgruppe Araki-Sasaki et al. (1995) isolierte aus Gewebstücken der Kornea mit Epithelschicht und Stromaschicht ohne enzymatische Wirkstoffe limbale korneale Epithelzellen von Spenderhornhäuten, um die Primärkulturen anschließend mit einem rekombinierten SV40-Adenovirus-Vektor zu infizieren. Sie etablierten so eine immortalisierte Zelllinie, die jedoch wegen der ungehemmten Proliferation für den therapeutischen Einsatz nicht in Frage kommt. Die Arbeitsgruppe Yam et al. (2002) kultivierte über einen längeren Zeitraum Hornhautepithel vom Kaninchen. Sie entdeckten in den ersten Passagen einen typischen Monolayer, der sich in späteren Passagen jedoch veränderte und Zellen unterschiedlicher Morphologie aufwies. Diese Ergebnisse stimmen mit vorherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe Yam et al. überein. Die Ergebnisse der Arbeit lassen sich mit diesen Untersuchungen vergleichen. Die in diesem Versuch isolierten Zellen zeigen in ihrer Morphologie ein ähnliches Erscheinungsbild. Sie bilden relativ rasch einen polygonalen Monolayer, der in den ersten Passagen sich nicht wesentlich verändert. In späteren Passagen nimmt das homogene Erscheinungsbild ab und endet schließlich in der Seneszenz der Zellen.

Aus der zentralen Region der Hornhaut ließen sich keine Kulturen etablieren. Dieses Ergebnis deutet auf eine fehlende Proliferationsfähigkeit des zentralen Hornhautepithels hin. Thoft, R.A. et Friend, J.(1983) vermuteten in ihren Hypothesen der Regeneration des kornealen Epithels, dass die Proliferation von Zellen nur in der Limbusregion erfolgte, während im Zentrum keine Zellteilung stattfinden sollte. Die Wundheilung erfolgte zentripetal vom Limbus Richtung Zentrum.

In diesen Untersuchungen der Zellen, die aus der Limbusregion isoliert und kultiviert worden waren, konnten nach drei Passagen die Matrixproteine Laminin und Tenascin C mittels immunzytochemischer Anfärbung entdeckt werden. Das Matrixprotein Kollagen Typ IV war nicht nachzuweisen. Nach sieben Passagen waren wieder die Proteine Laminin und Tenascin C immunzytochemisch nachweisbar. Kollagen Typ IV konnte nicht angefärbt werden, so dass dieses Protein nicht von den isolierten Zellen exprimiert wurde. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die kornealen Epithelzellen ein Expressionsmuster aufweisen, das dem der Limburregion des Hornhautepithels *in vivo* entspricht und dem der zentralen Region des Hornhautepithels *in vivo* widerspricht. Zudem deutet die kontinuierliche Expression von Tenascin C auf eine proliferative Eigenschaft hin, da Tenascin C meistens in Geweben mit hoher Regeneration oder Tumorgewebe gefunden wurde (Maseruka et. al; 1997). Es konnten keine Färbungen bei seneszenten Zellen durchgeführt werden, da nicht ausreichend Zellmaterial vorhanden war.

Die Matrixproteine Tenascin C und Laminin werden nach dem heutigen Forschungsstand, wie auf der Pre- ARVO 2000 vorgestellt, als Expressionsprodukt des limbalen kornealen Epithels angesehen. Das Matrixprotein Kollagen Typ IV wird als Expressionsprodukt des zentralen kornealen Epithels angesehen. Insbesondere das Matrixprotein Tenascin C ist ein Produkt, das vermehrt in Regionen mit hoher Selbsterneuerungsrates oder in Tumorregionen gefunden, wie z.B. in der limbalen Region der Hornhaut oder in der Haut (Maseruka et. al; 1997). Die untersuchte Expression der in diesem Versuch isolierten Zellen in frühen und späteren Passagen der Kultivierung gleicht der Expression vom limbalen Hornhautepithel *in vivo*. Zudem konnten in bisherigen Untersuchungen in isolierten und kultivierten limbalen kornealen Epithelzellen Tenascin C nachgewiesen werden (Maseruka et. al; 1997).

Das Wachstumsverhalten der Zellen wurde über mehrere Passagen bis hin zur Seneszenz untersucht. In den ersten acht Passagen zeigte sich ein starker Anstieg der kumulativen

Populationsverdoppelung auf zwölf Populationsverdoppelungen. In der neunten Passage waren die Epithelzellen seneszent. Es fand keine weitere Proliferation mehr statt. Die Zellzahl nahm deutlich ab.

Da zur Zeit noch kein immunologischer Marker bekannt ist, der bei einer proliferierenden Zelle in Kultur zwischen einer Stammzelle und einer Progenitorzelle unterscheiden kann, wird die Anzahl der Teilungszyklen als Anhaltspunkt genommen. Es sind zwar einige Proteine mit Stammzellen aus einigen Organen assoziiert, dennoch können wir noch nicht exakt sagen, ob es sich um eine Stammzelle oder eine Progenitorzelle handelt. In ihrem Wachstumsverhalten unterscheiden sich die Stammzelle und die Progenitorzelle jedoch deutlich voneinander. Die Stammzelle kann sich in der Theorie, soweit sie von Mediatoren zur Proliferation angeregt wird, immer wieder teilen und erneuern. Ihre Teilungszyklen dauern jedoch verglichen mit Progenitorzellen länger an, so dass die Stammzelle mehr Zeit braucht um Zellen neu zu bilden. Die Progenitorzelle hingegen kann sich nicht beliebig oft teilen und ist daher alleine nicht für den Erhalt eines Organs geeignet, da Ihre Anzahl an Teilungszyklen zeitlich limitiert ist. Ihre Teilungsgeschwindigkeit ist jedoch erheblich schneller als bei Stammzellen. Die Progenitorzelle ist daher geeignet, schnell einen Nachschub von differenzierten Zellen zu bilden. Die limitierte Anzahl an Teilungszyklen und die schnelle Teilungsgeschwindigkeit der isolierten und kultivierten limbalen kornealen Epithelzellen deutet auf die Anwesenheit von Progenitorzellen hin, die sich schnell teilen und vermehren.

In diesen Versuchen zeigte sich in frühen und späteren Passagen bei nicht dicht bewachsenen Kulturen ein hoher Zellanteil mit dem eingebauten Proliferationsmarker BrdU sowie bei dicht bewachsenen Kulturen hingegen ein geringer Anteil mit dem eingebauten Proliferationsmarker BrdU. Die erhöhte Proliferationsrate bei nicht konfluenten Zellschichten und die geringe Proliferationsrate bei dichten Zellschichten zeigt, dass nach Bildung eines dichten Monolayers eine Kontaktinhibition erfolgt. Die

Zellen zeigen hierbei epitheliale Eigenschaften. Eine Eigenschaft von epitheliale Gewebe ist die Kontaktinhibition. Durch die Kontaktinhibition von Zellen ist es gewährleistet, dass bei Defekten oder Verlusten in Zellschicht sich solange Progenitorzellen teilen, bis ein enger Kontakt zwischen den Zellen entsteht. Dies führt zu einer Hemmung der Proliferation und stellt sicher, dass nicht zu viele Zellen produziert werden. Die isolierten und kultivierten Hornhautepithelzellen zeigten hierbei eine mögliche Kontaktinhibition auf.

Da nach der Hypothese der kornealen Epithelerhaltung eine pluripotente Stammzelle die andauernde Erneuerung der Epithelschicht sichert, wird in der Zukunft ein Ziel sein, diese Zelle zu isolieren. Mit dieser Zelle könnte eine bessere Behandlung von Erkrankungen, die ihre Ursachen in der fehlenden Regeneration des Hornhautepithels haben, entwickelt werden.

Weitere Aufgaben der Zukunft werden, nach der Isolierung, Kultivierung und Charakterisierung der limbalen kornealen Epithelzellen, das Transplantieren der Zellen auf Amnionmembran sein. Zudem wird es wichtig sein, die Rolle des Amnion bei dem Heilungsprozeß genauer zu untersuchen, um festzustellen, welche Komponenten einen Benefit bei der Limbusstammzelleninsuffizienz erbringen.

VI. Zusammenfassung

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Epithelzellen aus der Limbusregion der Hornhaut gewonnen wurden und auch therapeutisch zum Einsatz kamen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es erlaubt, Epithelzellen von organkultivierten Spenderhornhäuten und Skleralringen zu gewinnen. Untersuchungen zur Charakterisierung der limbalen kornealen Epithelzellen wurden vorgenommen. Die Morphologie der Zellen zeigt in frühen und späteren Passagen einen gleichmäßigen Monolayer. Eine gleichmäßige Struktur des Monolayers war nur in den ersten Passagen zu finden. In der neunten Passage waren noch vereinzelt seneszente Zellen zu sehen. Die Morphologie entspricht der von epithelialen Zellen in Kultur. In frühen und späten Passagen der Kulturen konnten die Matrixproteine Tenascin C und Laminin, nicht jedoch das Matrixprotein Kollagen Typ IV, nachgewiesen werden. Das entspricht dem Expressionsmuster von limbalen kornealen Epithelzellen in vivo. BrdU-Anfärbungen in konfluenten und nicht konfluenten Kulturen zeigten einen erhöhten Einbau von BrdU in den Zellkernen in den nicht konfluenten Kulturen und einen verminderten Einbau von BrdU in den Zellkernen in den konfluenten Kulturen. Diese Ergebnisse deuten auf typische epitheliale Kontaktinhibition hin. Die Wachstumskurve der Zellen zeigte bis zur achten Passage eine starke Vermehrung der Zellen. Nach der achten Passage starben die Zellen. Das schnelle und in seinen Teilungszyklen begrenzte Wachstum entspricht dem Wachstumsverhalten von Progenitorzellen und ist hinweisend, jedoch nicht beweisend, dass diese Zellen Progenitorzellen sein könnten. Die aus dem Limbus des Hornhautepithel gewonnenen Zellen haben Eigenschaften von limbalen kornealen epithelialen Progenitorzellen. Die Isolation und Kultivierung von diesen Zellen gelang erfolgreich von organkultivierten Spenderhornhäuten und Skleralringen und ermöglicht eine erhöhte Behandlungskapazität von Patienten mit Limbusstammzelldefiziten.

Literaturverzeichnis

Araki-Sasaki K, Ohashi Y, Sasabe T, Hayashi K, Watanabe H, Tano Y, Handa H (1995)

An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization

IOVS, 36: 614-621

Castro-Munozledo F, Valencia-Garcia C, Kuri-Harcuch W (1997)

Cultivation of rabbit corneal epithelial cells in serum-free medium

IOVS, 38: 2234-2249

Diebold Y, Calonge M, Fernandez N, Lazaro MC, Callejo S, Herreras JM, Pastor JC

(1997)

Characterization of epithelial primary cultures from human conjunctiva

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 235(5):268-76

Dua HS, Azuara-Blanco A (2000)

Autologous limbal transplantation in patients with unilateral corneal stem cell deficiency

Br J Ophthalmol, 84:273-278

Grueterich M, Espana EM, Touhami A, Ti SE, Tseng SC (2002)

Long-term outcome of keratolimbal allograft with or without penetrating keratoplasty for total limbal stem cell deficiency

Ophthalmology, 109(8):1547-52

Grueterich M, Tseng SC (2002)

Human limbal progenitor cells expanded on intact amniotic membrane ex vivo

Archives of Ophthalmology, 120: 783-790

Maseruka H, Bonshek RE, Tullo AB (1997)

Tenascin-C expression in normal, inflamed, and scarred human corneas

Br J Ophthalmology, 81(8):677-82

Nakamura T, Koizumi N, Tsuzuki M, Inoki K, Sano Y, Sotozono C, Kinoshita S (2003)

Successful regrafting of cultivated corneal epithelium using amniotic membrane as a carrier in severe ocular surface disease

Cornea, 22: 70-71

Koizumi N, Cooper LJ, Fullwood NJ, Nakamura T, Inoki K, Tsuzuki M, Kinoshita S (2002)

An evaluation of cultivated corneal limbal epithelial cells, using cell-suspension culture

IOVS, 43: 2114-2121

Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, Inatomi T, Kinoshita S, Quantock AJ (2000)

Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane

IOVS, 41: 2506-2513

Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M (1997)

Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium

Lancet, 349: 990-993

Rama P, Bonini S, Lambiase A, Golisano O, Paterna P, De Luca M, Pellegrini G (2001)

Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency

Transplantation, 72: 1478-1485

Thoft RA, Friend J (1983)

The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance

IOVS, 24:1442-3

Yam HF, Lam DS, Pang CP (2002)

Changes of nuclear matrix in long-term culture of limbal epithelial cells

Cornea, 21(2): 215-219

DANKSAGUNG:

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Kathrin Engelmann für die Aufgabenstellungen und für die Betreuung der vorliegenden Arbeit.

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

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Monika Valtink, Fr. Dr. med. Fan Wang, Herrn Dr. med. Bilal Aboalchamat, Herrn Dr. med. Asbed Aintablian und Herrn Dr. med. Vladimir Dubilei.

Mein Dank gilt ferner allem Mitarbeiter des Hornhautlabors, des Fotolabors und des histologischen Labors für ihre wertvollen Ratschläge und praktischen Hilfeleistungen.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Vinodh Kakkassery
Geburtstag und -ort : 16. Januar 1974 in Salzkotten
Familienstand : ledig

Ausbildung

07.80-06.84 Katholische Grundschule Salzkotten
07.84-06.93 Privates Liebfrauengymnasium Büren/ Westfalen
10.93- 10.95 vorklinisches Studium der Medizin an der RWTH Aachen
10.95- 10.96 klinisches Studium der Medizin an der RWTH Aachen
10.96- 11.00 klinisches Studium der Medizin an der Universität Hamburg

Weiterbildung

01.08.01- 31.01.03 Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
01.02.03- 10.04.03 Schiffsarzt des Segeltoppschoners *Thor Heyerdahl*, Teilstrecke Belize- Kuba – Bermudas - Azoren
01.05.03- 31.10.03 Mitarbeit im Transplantationslabor der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
01.11.03- 31.12.04 Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Charite Universitätsmedizin zu Berlin, Campus Virchow

Wissenschaftliche Vorträge

26.09.02 Vortrag auf dem Jahrestreffen der *Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* in Berlin
06.05.02 Vortrag auf dem Jahrestreffen der *Association for Research in Vision and Ophthalmology* in Fort Lauderdale/ USA

Berlin, 07.02.2005

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

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

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

Vinodh Kakkassery